



Universidad de Granada  
Facultad de Ciencias



**IMPORTANCIA DE LA BIOSÍNTESIS BACTERIANA  
DE LEUCINA PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LA  
SIMBIOSIS *RHIZOBIUM*-LEGUMINOSA**



**JULIO M. SANJUÁN PINILLA**

**TESIS DOCTORAL  
2001**



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Importancia de la biosíntesis bacteriana de leucina para el establecimiento de la simbiosis

***Rhizobium-Leguminosa***

Memoria que presenta el Licenciado en Ciencias Biológicas

D. JULIO MANUEL SANJUÁN PINILLA

para aspirar al grado de Doctor

Fdo: Julio Manuel Sanjuán Pinilla

VºBº

El Director

Fdo: Juan Sanjuán Pinilla

Doctor en Ciencias Biológicas

Científico Titular del C.S.I.C.



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Importancia de la biosíntesis bacteriana de leucina para el establecimiento de la simbiosis

***Rhizobium-Leguminosa***

*Julio Manuel Sanjuán Pinilla*

TESIS DOCTORAL

2001

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Julio Manuel Sanjuán Pinilla  
D.L.: GR. 3051-2009  
ISBN: 978-84-692-5091-4



Esta Memoria Doctoral ha sido realizada en el  
Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas  
Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín  
(C.S.I.C.), Granada, durante los años 1996-2001.



A mis padres



A Amelia



En esta tesis se resumen, profesionalmente hablando, los últimos cinco años de mi vida, cinco años llenos de trabajo, de esfuerzo, de buenos y malos ratos, de risas y de llantos, de alegrías y de penas, de esperanzas y desilusiones, pero todo, lo bueno y lo malo, compartido con compañeros de trabajo, compañeros que se han convertido en amigos, y sin los cuales no se hubiera podido realizar esta tesis doctoral. Por eso quiero agradecerles a todos la ayuda y el esfuerzo que me han prestado.

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento al Profesor D. José Olivares por haberme dado la oportunidad de integrarme en su magnífico grupo de investigación. Su apoyo y confianza continua, así como su “sabiduría” científica y humana han sido de gran ayuda para poder llevar a cabo este trabajo.

De forma muy especial quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Juan Sanjuan, primero por iniciarme en esto de la investigación, al darme la oportunidad de realizar la tesis bajo su dirección, y segundo por enseñarme que el trabajo y la constancia son la base de todo. Es difícil agradecer en pocas palabras el tiempo y esfuerzo que ha dedicado durante estos años para que esta tesis sea una realidad. Por eso lo único que puedo decir es ¡¡¡ Gracias !!!.

Por supuesto también quiero agradecer a mi hermano Juan, el cual siempre me ha apoyado en todo y de todas las maneras....Gracias por estar siempre ahí cuando te he necesitado, y gracias también por tratarme, no solo como un hermano, sino como un compañero y un amigo al cual siempre puedo acudir.

También quiero agradecer a la Prof. Carmen Lluch Plá por haber sido mi tutora en la Universidad de Granada, y por su gran eficacia y disponibilidad siempre que acudía ella.

No puedo dejar de agradecer a aquellos con los que he convivido día a día, codo con codo, y sin cuya ayuda no podría haber llegado a buen fin esta tesis. Todos ellos han estado siempre dispuestos a ayudarme, desde el primero hasta el último día: gracias a Jose y M<sup>a</sup> Jose por su inestimable ayuda antes, durante y después de su estancia en Dinamarca, a Jose A. Acevedo y a Lola, sin cuyo apoyo técnico y humano no sé lo que hubiera hecho, a M<sup>a</sup> Jose Soto por sus innumerables ayudas y consejos de tipo científico y no científico, a Pieter por su disponibilidad en todo lo que le he pedido, a Daniel y a Ana, que a pesar del poco tiempo que llevamos juntos ya me han demostrado su amistad, estando siempre dispuestos a ayudarme, a Quina y Soco, sin las cuales muchos de los experimentos hubieran sido materialmente imposibles de realizar, y gracias también porque sois las que

## Agradecimientos

---

mejor y más tiempo llevais soportándome (que no es poco), y por demostrarme vuestra amistad día a día.

Agradezco también a todas las personas que forman o han formado parte del grupo del Dr. Eulogio Bedmar: Eulogio, M<sup>a</sup> Jesús, Graciella, C. Xu, Mariangel, Álvaro, M<sup>a</sup> Jose, Leo, M<sup>a</sup> Luisa, y en especial a Soco Mesa, por su ayuda y amistad durante estos años de tesis que hemos vivido en paralelo.

No me puedo olvidar del resto de mis compañeros del Dpto. de Microbiología con los cuales he compartido, sobre todo, buenos momentos, tanto con los más “veteranos” (Mariam Vázquez, Nuria, M<sup>a</sup> Jose Pozo, Coral, Juanma, Inma, Pepe Garcia, Karim, Juan Antonio, Julia, Javier Palenzuela y Estefanía “la guapita”), como con los más jóvenes (Ruth, Astrid, Carlos, Alejandro), así como con el resto de personas que forman el Dpto. de Microbiología. Todos ellos, directa o indirectamente, en mayor o menor medida, han contribuido a que los buenos ratos superen con creces a los ratos no tan buenos.

Agradezco también a Cesar y Javier por su ayuda de tipo informático.

También quiero agradecer la ayuda que me proporcionaron en temas bioquímicos Iva McCarthy y el Dr. Juan Jose Lázaro, así como al Dr. José Palma, que me proporcionó, cuando más lo necesitaba, Acetil CoA.

Quiero mostrar mi agradecimiento a Luis Aparicio y a la Dra. Isabel López-Calderón por la ayuda prestada en la cuantificación de aminoácidos excretados por las raíces de alfalfa.

También he de agradecer a la Dra. Mercedes Lucas y a la Prof. María Rosario de Felipe por ayudarme en los estudios de microscopía de nódulos, así como por su gran amabilidad y disponibilidad durante mis cortas estancias en el Centro de Ciencias Medioambientales.

Quiero agradecer también a aquéllos con los que he compartido mesa y mantel durante estos últimos años: Pepe, Soco, Juan, Karim, Quina, Pilar, Ruth, etc..., por hacer que la sobremesa fuese más “llevadera”. También me gustaría dar las gracias a todos los miembros de la Peña Experimental “Carlos Prieto”, con los que cada martes me “desahogaba” jugando al fútbol.

Tampoco se me puede olvidar dar las gracias a Belén por hacerme sentir como en casa durante gran parte de la realización de esta tesis.

A mis padres, ejemplos de trabajo y sacrificio por sus hijos, quiero dedicarles esta tesis, ya que gracias a ellos he llegado hasta aquí. Sin vuestra ayuda y confianza no podría haber conseguido nada. Gracias también a mis hermanos, Antonio, Juan, Paco e Inda, que me han apoyado y ayudado en todo momento.

Gracias también a “mi familia” de Jaén, que de una manera u otra también han contribuido a que esto sea una realidad.

A Amelia por apoyarme desde un principio y confiar en mí. Sin tu apoyo y tu cariño estoy seguro de que no lo hubiera conseguido. Gracias por tener tanta paciencia, por aguantar mis “cabreos” y agobios, gracias por el día a día, porque no se que hubiera hecho sin tenerte a mi lado. Gracias por todo







## Abreviaturas

---

aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ap	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	5'-Trifosfato de adenosina
BSA	Albúmina de suero bovino
Cm	Cloranfenicol
CoA	Coenzima A
dNTP	5'-Trifosfato de 2'-desoxinucleósido
DO	Densidad óptica
DTNB	5,5'-ditiobis 2-nitrobenzónico
dUTP	5'-Trifosfato de desoxiuridina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
kb	kilobases
Km	Kanamicina
LEU, leu	L-Leucina
min	minutos
MM	Medio Mínimo
<i>nod</i>	Nodulación
nt	nucleótidos
ONPG	o-Nitrofenil-β-D-galactopiranosido
ORF, Orf	Secuencia con fase de lectura abierta
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PNPG	p-nitrofenil-β-D-glucuronido
rpm	Revoluciones por minuto
s	segundos
SDS	Dodecil sulfato sódico
Sm	Estreptomina
Spc	Espectinomicina
TBE	Tris-Ácido bórico-EDTA
Tc	Tetraciclina
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometano
α-IPM	2-Isopropilmalato
α-KIC	2-Cetoisocaproato
α-KIV	2-Cetoisovalerato
β-IPM	3-Isopropilmalato















## INTRODUCCIÓN

<b>1. La simbiosis <i>Rhizobium</i>-leguminosas</b>	2
1.1. Fijación de nitrógeno por leguminosas	2
1.2. Especificidad de la simbiosis	2
<b>2. Etapas del proceso de nodulación</b>	3
2.1. Quimiotaxis y colonización de la raíz	3
2.2. Adhesión de las bacterias a la raíz	4
2.3. Curvatura de pelos radicales y formación del cordón de infección	5
2.4. Formación del primordio nodular	6
2.5. Endocitosis de las bacterias y diferenciación en bacteroides	6
<b>3. Estructura de los nódulos de las leguminosas</b>	7
3.1. Tipos de nódulos de leguminosas	7
3.2. Estructura del nódulo	8
<b>4. Los genes de nodulación en <i>Rhizobium</i></b>	12
4.1. Regulación de la expresión de los genes de la nodulación	13
4.2. Expresión de <i>nodD</i>	14
4.3. La proteína NodD	18
4.4. Otros elementos reguladores de la expresión de genes de la nodulación	19
4.5. Factores adicionales que modulan la expresión de genes de la nodulación	20
4.6. Expresión de los genes de la nodulación durante las etapas tardías de la simbiosis	21
<b>5. Funciones de los genes de la nodulación</b>	21
5.1. Biosíntesis de la estructura básica del factor Nod	22
5.2. Modificaciones de los factores Nod	22
5.3. Transporte y secreción de factores Nod	26
5.4. Genes de nodulación no implicados en la biosíntesis de factores Nod	30
5.5. Respuestas de la planta inducidas por los factores Nod	30
5.6. Relación estructura-función de los Factores Nod. Mecanismos de percepción	34

<b>6. Otros componentes bacterianos necesarios para el proceso de nodulación e infección</b>	35
6.1. Exopolisacáridos (EPS)	36
6.2. Glucanos cíclicos	37
6.3. Lipopolisacáridos (LPS)	37
6.4. Polisacárido capsular de tipo K (KPS)	39
<b>7. Otros genes bacterianos necesarios para el establecimiento de la simbiosis</b>	39
7.1. Genes necesarios para la biosíntesis de aminoácidos	40
7.2. Genes implicados en la biosíntesis de bases nitrogenadas	42
<b>8. Biosíntesis de leucina en bacterias</b>	43
 <b>OBJETIVOS</b>	 47
 <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	 
 <b>1. Cepas bacterianas y plásmidos</b>	 49
<b>2. Medios de cultivos y conservación de cepas bacterianas</b>	51
2.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	51
2.2. Medios de cultivo para <i>Rhizobium</i>	52
2.2.1. <i>Sinorhizobium meliloti</i>	52
2.2.2. <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	53
2.3. Antibióticos	54
2.4. Preparación de aminoácidos	55
2.5. Conservación de cepas bacterianas	55
<b>3. Aislamiento y purificación de ADN</b>	55
3.1. Extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina	55
3.2. Extracción de ADN plasmídico mediante QIAprep Spin Miniprep Kit	56
3.3. Extracción de ADN genómico	57
3.4. Determinación de la concentración de ADN	57
<b>4. Manipulación del ADN</b>	58
4.1. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción	58
4.2. Separación e identificación de fragmentos de restricción mediante	

electroforesis en gel de agarosa	58
4.2.1. Electroforesis de ADN	58
4.2.2. Revelado de geles y fotografía	59
4.2.3. Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción	59
4.3. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	59
4.4. Manipulación de los fragmentos de restricción	60
4.4.1. Ligación de fragmentos de restricción con vectores de clonación	60
4.4.2. Relleno de extremos 5' protuberantes de fragmentos de restricción	61
4.4.3. Eliminación de extremos 3' protuberantes de fragmentos de restricción	61
4.5. Preparación y transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	61
4.6. Experimentos de hibridación ADN-ADN	62
4.6.1. Transferencia de ADN a filtros de nylon	62
4.6.2. Marcaje de sondas de ADN	63
4.6.3. Hibridación ADN-ADN con sonda no radioactiva	63
<b>5. Secuenciación</b>	64
5.1. Obtención de cebadores y secuenciación automática	64
5.2. Análisis informático de secuencias de ADN	64
<b>6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</b>	64
<b>7. Transferencia de plásmidos entre cepas bacterianas</b>	65
7.1. Cruces simples	65
7.2. Cruces triparentales	65
<b>8. Control de la expresión génica</b>	
8.1. Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa	66
8.2. Determinación de la actividad $\beta$ -glucuronidasa	67
<b>9. Determinación de la actividad <math>\alpha</math>-IPM sintasa</b>	67
<b>10. Ensayos con plantas</b>	68
10.1. Plantas	68
10.2. Solución nutritiva	68
10.3. Esterilización y germinación de semillas	69
10.4. Cultivos axénicos y ensayos de nodulación	70
10.5. Cuantificación de aminoácidos excretados por raíces de alfalfa.	71

## RESULTADOS

1. Aislamiento y caracterización de mutantes de <i>S. meliloti</i> auxotrofos para leucina	73
2. Caracterización de la región <i>leuA</i> de <i>S. meliloti</i> GR4	79
3. Construcción y caracterización de cepas auxotrofas de <i>S. meliloti</i> portadoras de una delección del gen <i>leuA</i>	93
4. Comportamiento simbiótico de cepas auxotrofas para leucina con un gen <i>leuA</i> deleccionado	101
5. Comportamiento simbiótico de cepas LeuA <sup>-</sup> en medios suplementados con leucina o sus precursores	102
6. Expresión de los genes de nodulación en cepas LeuA <sup>-</sup> de <i>S. meliloti</i>	110
7. Expresión de genes <i>nod</i> en cepas superproductoras de proteínas NodD	114
8. Caracterización del gen <i>leuC</i> de <i>S. meliloti</i>	123
9. Aislamiento y caracterización de la región <i>leuA</i> de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> UPM791	135
10. Análisis filogenético de los genes <i>leuA</i> de <i>S. meliloti</i> y <i>R. leguminosarum</i>	136
11. Construcción de mutantes LeuA <sup>-</sup> de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	151
12. Fenotipo simbiótico de mutantes LeuA <sup>-</sup> de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	152
13. Expresión de los genes de nodulación en cepas LeuA <sup>-</sup> de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	157
14. Regulación de la expresión de <i>leuA</i> en <i>Rhizobium</i>	167
<b>DISCUSIÓN</b>	185
<b>CONCLUSIONES</b>	199
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	201



# **INTRODUCCIÓN**

---

El nitrógeno es muy abundante en nuestro planeta, aunque, paradójicamente, es uno de los principales factores limitantes del crecimiento vegetal. Esto es consecuencia de la incapacidad de los organismos eucarióticos para utilizar el dinitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>). Las plantas sólo pueden utilizar formas de nitrógeno combinado, generalmente amonio o nitrato, que son derivadas del N<sub>2</sub> atmosférico a través del proceso denominado fijación de nitrógeno. Este término incluye la reducción del N<sub>2</sub> hasta óxidos de nitrógeno o hasta amonio, bien por procesos fisico-químicos (naturales o inducidos por el hombre) o por procesos biológicos. La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es una propiedad atribuible sólo a organismos procarióticos, y es responsable de aproximadamente 2/3 del total de nitrógeno fijado en la biosfera.

La FBN es un proceso enzimático por el que algunos microorganismos procariotas, los diazotrofos, son capaces de reducir el N<sub>2</sub> atmosférico hasta amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), incorporándolo de este modo a la biosfera en una forma asimilable por las plantas. La capacidad de los diazotrofos para fijar N<sub>2</sub> deriva de un complejo enzimático llamado nitrogenasa, cuya estructura y propiedades son muy similares en todas las especies que lo poseen. El sistema nitrogenasa más abundante entre los diazotrofos se compone de dos proteínas, la dinitrogenasa o molibdo-ferro-proteína, y la dinitrogenasa reductasa o ferro-proteína, esta última encargada de la transferencia de electrones a la dinitrogenasa, que en último término lleva a cabo la reducción de N<sub>2</sub> hasta amonio. Este proceso de fijación de nitrógeno puede resumirse según la siguiente reacción:



La reacción catalizada por la nitrogenasa tiene un requerimiento absoluto por ATP y poder reductor. La producción de H<sub>2</sub> por la nitrogenasa tiene lugar concomitantemente con la reducción del N<sub>2</sub>, lo que supone una fuente de ineficiencia de la enzima y una pérdida de energía. Se estima que hasta un 25% del flujo de electrones a través de la nitrogenasa se desvía hacia la reducción de protones (Evans *et al.*, 1981). Además, la nitrogenasa es muy sensible al oxígeno, por lo que la concentración de oxígeno ambiental es un factor regulador del proceso de fijación de nitrógeno en la mayoría de organismos diazotrofos.

### 1. LA SIMBIOSIS *RHIZOBIUM*-LEGUMINOSAS

#### 1.1. Fijación de nitrógeno por leguminosas

Entre todas las bacterias con capacidad para la fijación biológica de nitrógeno, son de destacar aquellas pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* y *Allorhizobium* (denominadas colectivamente *Rhizobium*), que se establecen en simbiosis con plantas leguminosas para llevar a cabo el proceso de fijación del dinitrógeno atmosférico. Su importancia viene determinada, además de por el volumen de nitrógeno fijado que dichas simbiosis aportan a la biosfera, por las siguientes razones:

- La eficiencia fijadora de esta simbiosis es 10-20 veces mayor que en la mayoría de diazotrofos libres, debido al ambiente casi ideal que proporciona el nódulo radical, el órgano fijador por excelencia.
- La nitrogenasa de este sistema utiliza energía directamente derivada de la fotosíntesis.
- El nitrógeno fijado es utilizado y almacenado directamente en los tejidos vegetales.
- La importancia agronómica de las leguminosas, que constituyen la principal fuente de proteínas vegetales para humanos y animales.

En las leguminosas, la FBN tiene lugar en los nódulos, originados generalmente en la raíz de la planta como consecuencia de la infección de la misma por parte de la bacteria. En el nódulo, verdadero nuevo órgano vegetal, las bacterias se transforman en unas formas especializadas, los bacteroides, que utilizan los compuestos fotosintetizados por la planta como fuente de energía para la nitrogenasa. El amonio sintetizado por los bacteroides es exportado a las células vegetales e incorporado al metabolismo de la planta.

#### 1.2. Especificidad de la simbiosis

La interacción *Rhizobium*-leguminosa es altamente específica, lo que significa que en general cada especie bacteriana se establece en simbiosis con uno o pocos géneros o especies vegetales, si bien existen ejemplos de bacterias con amplio rango de hospedador, capaces de nodular a un elevado número de géneros de leguminosas (Tabla I.1). Algunas especies vegetales, p.e. *Phaseolus*, pueden ser noduladas por distintas especies de

bacterias. Aunque pueda parecer que no existe un aparente correlación entre especie bacteriana y plantas hospedadora, la especificidad de hospedador viene determinada por el tipo de moléculas señal producida por cada pareja bacteria-planta (Denarié *et al.*, 1996).

**Tabla I.1.** Ejemplos de asociaciones *Rhizobium*-leguminosas.

<b>Especies Bacterianas</b>	<b>Planta Hospedadora</b>
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	
biovar viciae	<i>Pisum, Vicia, Lens</i>
biovar trifolii	<i>Trifolium</i>
biovar phaseoli	<i>Phaseolus</i>
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Lotus</i>
<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Leucaena, Phaseolus, Medicago, Macroptilium</i>
<i>Rhizobium galegae</i>	<i>Galega</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glicine, Macroptilium, Vigna</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>Glycine, Vigna</i>
<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	Amplio rango de hospedador, <i>Parasponia</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania</i>

## 2. ETAPAS DEL PROCESO DE NODULACIÓN

En general los nódulos de las leguminosas se forman en las raíces de la planta, si bien existen casos de formación de nódulos en tallos, como en *Sesbania*. La formación del nódulo fijador depende de un continuo y adecuado intercambio de señales entre los simbioses (Broughton *et al.*, 2000). Este intercambio de señales comienza incluso antes de que los simbioses entren en contacto físico.

### 2.1. Quimiotaxis y colonización de la raíz.

Antes de llevarse a cabo la infección de las raíces de leguminosas por *Rhizobium* debe de haber un crecimiento bacteriano en la rizosfera (Hirsch *et al.*, 1992), inducido por compuestos exudados por las raíces de leguminosas. Estos compuestos, entre los que se encuentran ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos y flavonoides, actúan como quimioatrayentes y estimulan el crecimiento de *Rhizobium*. La composición del exudado varía dependiendo de la planta hospedadora, de su estado de desarrollo y de factores

medioambientales. De especial importancia durante las etapas iniciales son los compuestos de tipo flavonoide, que cumplen varias funciones (Dowling *et al.*, 1986; Gaworzewska *et al.*, 1982):

- 1.- Quimioatrayendo a *Rhizobium* hasta las raíces de plantas leguminosas.
- 2.- Estimulando el crecimiento bacteriano alrededor de la raíz.
- 3.- Induciendo la activación de genes de nodulación bacterianos.

En *S. meliloti* el efecto quimiotáctico de los flavonoides está estrechamente relacionado con la capacidad de inducción de genes *nod*, ya que la quimioatracción requiere genes *nodD* y genes *nodABC* (Caetano-Anollés *et al.*, 1988). Además, algunos flavonoides como la luteolina, estimulan el crecimiento de *Rhizobium* (Hartwig *et al.*, 1991).

### 2.2. Adhesión de las bacterias a la raíz

Tras la colonización de la superficie de la raíz, las células de *Rhizobium* se adhieren fundamentalmente a los pelos radicales jóvenes. Esta adhesión tiene lugar de forma polar, es decir, es el extremo de la célula bacteriana el que contacta con el pelo radical.

Se sabe poco a cerca de los mecanismos que controlan la adhesión de las bacterias a la superficie celular vegetal, aunque existen pruebas de que comienza con una unión débil inicial, seguida por un anclaje con filamentos de celulosa sintetizados por la bacteria (Smit *et al.*, 1987). Aunque la unión inicial es esencial para la nodulación, la etapa de anclaje no lo es tanto, ya que mutantes incapaces de producir este anclaje no se ven afectados en la nodulación (Smit *et al.*, 1987). En el proceso de adhesión pueden estar implicados componentes superficiales de *Rhizobium*, como exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPS), antígenos capsulares (CPS) y proteínas superficiales, como ricadhesina y Bj38. Por parte de la planta, parecen ser necesarios compuestos como lectinas o un homólogo de vitronectina (Swart *et al.*, 1994). Estas lectinas estarían implicadas en la adhesión utilizando los componentes superficiales bacterianos como sitios de unión (Díaz *et al.*, 1996; Dazzo y Truchet, 1987; Kijne *et al.*, 1997). Sin embargo no se han descrito mutantes adecuados para corroborar esta hipótesis.

La ricadhesina es una proteína superficial de unión a calcio que actuaría uniéndose a fibrillas de celulosas sintetizada por la bacteria. La adhesina Bj38 se ha caracterizado en

*Bradyrhizobium*, donde mutantes en el gen que codifica para esta proteína están afectados en adhesión y nodulación (Ho *et al.*, 1993).

También se ha sugerido que los genes implicados en la síntesis de  $\beta$ -(1.2)-glucanos, *ndvA* y *ndvB*, podrían tener alguna función en la adhesión, ya que mutaciones en estos genes causan cambios superficiales, lo que se traduce en una ineficiencia en la infección y en la nodulación (Dylan *et al.*, 1986).

Por otro lado, algunos autores han descrito que una correcta expresión de los genes de nodulación podría estar implicada en una mejor adhesión de *Rhizobium* a su planta hospedadora (Dazzo *et al.*, 1985, 1988). Distintas condiciones ambientales pueden afectar la eficiencia de adhesión. Así, la presencia de calcio puede ayudar en el anclaje de adhesinas a la superficie celular, lo cual también se puede ver afectado por el pH del medio (Swart *et al.*, 1994). Además, limitaciones en la disponibilidad de elementos como manganeso, nitrógeno y oxígeno pueden afectar a la capacidad de *Rhizobium* de adherirse a los pelos radicales (Swart *et al.*, 1994).

### 2.3. Curvatura de pelos radicales y formación del cordón de infección

La adhesión de *Rhizobium* a los pelos radicales jóvenes provoca la primera respuesta microscópicamente visible: la deformación y curvatura del pelo radical. Esta curvatura se produce por una estimulación local del crecimiento del extremo apical del pelo radical y no por una inhibición del crecimiento. La correcta expresión de genes *nod* y genes implicados en la síntesis de exopolisacáridos son necesarios para la inducción de estos cambios en los pelos radicales.

Cuando las células de *Rhizobium* inducen la curvatura de los pelos radicales, algunas quedan atrapadas en ella, desencadenando el proceso de infección, que comienza con una hidrólisis muy localizada de la pared celular vegetal en el punto de curvatura del pelo radical. Como consecuencia, se produce una invaginación de la membrana plasmática y el depósito de nuevo material, parecido en composición a la pared vegetal, en la parte externa de dicha membrana. El crecimiento continuo de esta estructura origina el cordón de infección. Dentro de este cordón las bacterias se multiplican activamente y se encapsulan en polisacáridos extracelulares (Leigh y Walker, 1994; Reuhs *et al.*, 1995).

### 2.4. Formación del primordio nodular

Simultáneamente a la formación del cordón de infección, determinadas células del córtex sufren una serie de cambios morfológicos, como reorganización de los microtúbulos, migración del núcleo hacia el centro de la célula y la formación radial de nuevas paredes celulares, lo que se traduce en una reactivación de la actividad mitótica, que origina lo que se denomina como primordio nodular. Dependiendo de cuáles sean las células del córtex que se dividen, se originará un nódulo de tipo indeterminado ó determinado. Los nódulos indeterminados tienen un meristemo apical persistente que se origina como consecuencia de la actividad mitótica de células localizadas en la parte interna del córtex. Este tipo de nódulos indeterminados son característicos de leguminosas de clima templado. En cambio, las leguminosas de origen tropical, tales como soja y judía, forman nódulos determinados en los que la actividad mitótica del córtex externo de la raíz cesa durante el desarrollo, siendo la expansión celular la responsable de la forma globosa del nódulo.

El cordón de infección transportará las bacterias desde el extremo del pelo radical hasta el primordio nodular. El porcentaje de infecciones que finalmente dan lugar a la formación de nódulos fijadores es muy bajo. Esto es como consecuencia del aborto de muchos de los canales de infección que se originan. Se ha sugerido que dichos abortos están asociados con una respuesta de hipersensibilidad (HR) de la planta (Hirsch *et al.*, 1992).

### 2.5. Endocitosis de las bacterias y diferenciación en bacteroides

La liberación de las bacterias al interior de las células del primordio ocurre mediante un mecanismo de endocitosis específico, por el que las bacterias son liberadas al citoplasma rodeadas de una membrana de origen vegetal, la membrana peribacteroidal. Esta membrana resultará fundamental para el intercambio de metabolitos entre la bacteria y la planta. Una vez dentro de la célula vegetal, el rizobio puede dividirse una o pocas veces más. La membrana peribacteroidal se divide en sincronía con la división de la bacteria, por lo que finalmente cada bacteroide quedará encerrado en su propia membrana formando la unidad simbiótica denominada simbiosoma. En el simbiosoma cesa la multiplicación de las

bacterias, que se transforman en los llamados bacteroides, de mayor tamaño y con una morfología irregular. En el bacteroide se lleva a cabo la reducción del dinitrógeno hasta amonio, el cual es exportado a la célula vegetal. Aunque hasta hace poco se pensaba que el amonio era exportado directamente, estudios recientes indican que el producto de la nitrogenasa es exportado desde el bacteroide en forma de alanina (Waters *et al.*, 1998), si bien en la membrana peribacteroidal ha sido caracterizado un canal de amonio que podría estar implicado en la transferencia del nitrógeno fijado a la célula hospedadora (Kaiser *et al.*, 1998).

### **3. ESTRUCTURA DE LOS NÓDULOS DE LAS LEGUMINOSAS**

#### **3.1. Tipos de nódulos de leguminosas**

Dependiendo de si el primordio nodular tiene su origen en el córtex interno o en el córtex externo de la raíz, las células meristemáticas mantendrán o no su actividad mitótica durante el desarrollo del nódulo. Estas diferencias determinan la estructura y la morfología del nódulo maduro, pudiéndose clasificar en dos tipos: nódulos indeterminados y nódulos determinados. Las principales diferencias entre ambos tipos de nódulos se muestran en la Tabla I.2.

**Tabla I.2.** Diferencias entre nódulos indeterminados y nódulos determinados.

	<b>Indeterminado</b>	<b>Determinado</b>
<b>Origen del Primordio Nodular</b>	Córtex interno	Córtex externo
<b>Crecimiento del Nódulo</b>	División celular	Expansión celular
<b>Forma del Nódulo</b>	Alargada	Redondeada
<b>Tipo de Leguminosa</b>	Clima templado	Clima tropical
<b>Ejemplo</b>	<i>Medicago sativa</i>	<i>Glycine max</i>

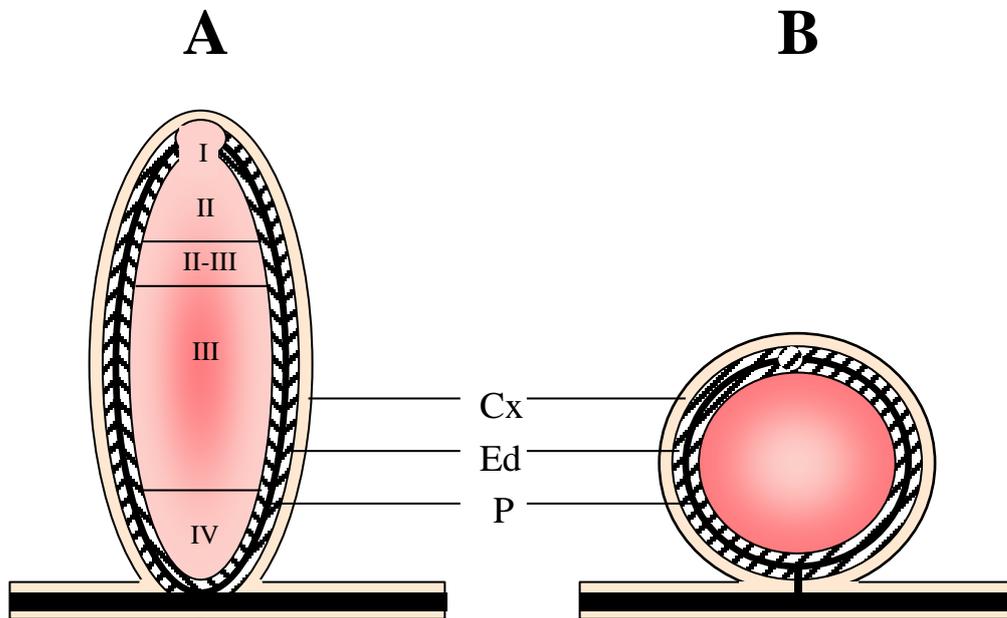
### 3.2. Estructura del nódulo

En un corte trasnversal de un nódulo de leguminosa pueden observarse dos zonas concéntricas:

- 1) Tejido periférico: consta de un córtex externo, una endodermis y un parénquima o córtex interno. El córtex externo está formado por células muy vacuoladas, que protegen al nódulo del medio externo. El parénquima posee una estructura compacta con pocos espacios intercelulares, y funciona como una barrera para la difusión del oxígeno. Es aquí donde se encuentran los haces vasculares (Figura I.1).
- 2) Tejido central: se encuentran células infectadas y no infectadas. Este tejido central es muy distinto según se trate de un nódulo determinado ó de un nódulo indeterminado. En un nódulo determinado no existe un meristemo persistente, por lo que todas las células del tejido central presentan en cada momento el mismo estado de desarrollo. Su crecimiento, basado fundamentalmente en el aumento del tamaño de sus células, junto con la ausencia de un meristemo apical, determinan su forma esférica (Figura I.1). En este tejido central, dentro de las células no infectadas, tiene lugar parte de la asimilación y transporte del amonio producido en las células infectadas.

El desarrollo de un nódulo indeterminado es un proceso continuo y dinámico. Así, en una sección longitudinal de un nódulo maduro se pueden observar simultáneamente los distintos estadios de desarrollo del mismo, ya que presenta un gradiente de diferenciación típico desde la parte más distal, donde se localiza el meristemo, hasta la parte más próxima a la raíz, donde se encuentran las células más viejas. De esta forma en el tejido central de un nódulo indeterminado se pueden distinguir 4 zonas (Fig. I.1), utilizando como criterios los cambios estructurales de las células vegetales y bacteriana, la morfología del bacteroide, la acumulación de almidón y el comienzo de la fijación de nitrógeno:

- Zona I ó zona meristemática: constituye el meristemo apical persistente, y está compuesto por pequeñas células en continua división, de ahí el crecimiento continuado del nódulo. Esta zona genera constantemente nuevas células que van diferenciándose progresivamente a través de las distintas zonas del tejido central del nódulo.



**FIGURA I.1.** Representación esquemática de la estructura de un nódulo indeterminado (A) y un nódulo determinado (B). Cx: Córtez nodular externo; Ed: endodermis nodular; P: parenquima; **I**: zona meristemática; **II**: zona de prefijación; **II-III**: interzona; **III**: zona de fijación; **IV**: zona de senescencia.







-Zona II ó zona de invasión ó de prefijación: es la región adyacente al meristemo apical. En su parte más distal, el cordón de infección comienza a penetrar en las células meristemáticas, que dejan de dividirse, y las bacterias son liberadas al interior de las células vegetales rodeadas por la membrana peribacteroidal.

-Interzona II-III: localizada entre la zona II de prefijación y la zona III de fijación. Se caracteriza por la acumulación de almidón en las células infectadas, llenas de bacteroides, y la inducción de los genes *nif*.

- Zona III ó de zona de fijación: donde las células vegetales han alcanzado su máximo tamaño y se encuentran llenas de bacteroides que realizan la fijación simbiótica de nitrógeno. También aparecen pequeñas células no infectadas que proporcionan el soporte metabólico necesario para el proceso de fijación. Las células infectadas de esta zona presentan un color rosado característico, debido a la presencia de leghemoglobina en su interior. Esta proteína juega un papel fundamental en el aporte controlado de oxígeno al bacteroide, clave para el adecuado funcionamiento de la nitrogenasa.

- Zona IV ó zona de senescencia: formada por células infectadas que han perdido la capacidad de fijar nitrógeno, y que al igual que los bacteroides, degeneran y mueren.

La degeneración de ambos simbioses ha sido hasta ahora considerada el punto final de la interacción simbiótica. Sin embargo, recientemente se ha descrito la existencia de una denominada zona V, adjacente a la zona IV, presente en nódulos de alfalfa de más de 6 semanas. En esta zona V ocurre una nueva ronda de liberación de bacterias de los cordones de infección viejos, lo que conlleva la reinvasión de células vegetales senescentes. Al parecer, en esta zona V existe una concentración de oxígeno compatible con la multiplicación celular y la expresión de genes *nif*, si bien no se ha detectado en ella actividad nitrogenasa. Se ha propuesto que esta zona V representa un nicho ecológico donde las bacterias realizan un tipo de vida saprofítico en el interior de las células vegetales degeneradas (Timmers *et al.*, 2000). Estos autores indican que la existencia de esta zona V es la evidencia que faltaba para corroborar el carácter mutualista de esta interacción, pues hasta ahora se aducía que en esta asociación la bacteria no tenía un aparente beneficio, o al menos no se trataba de una auténtica simbiosis mutualista pues los

simbiontes no se benefician simultáneamente de la asociación, al menos de forma aparente. La planta se beneficia de la fijación de nitrógeno por formas bacterianas que no son viables para la multiplicación, mientras que la bacteria se beneficia fundamentalmente tras la degeneración del nódulo y su liberación al suelo.

#### 4. LOS GENES DE LA NODULACIÓN EN *RHIZOBIUM*

En muchas especies de rizobios, la mayoría de los genes de nodulación se encuentran localizados en el plásmido simbiótico (pSym), aunque en *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium loti* los genes se encuentran localizados en el cromosoma. Los genes de la nodulación, denominados *nod*, *nol* y *noe*, se definen como genes que están implicados en nodulación ó que están coordinadamente regulados con éstos.

Originalmente los genes de nodulación se clasificaron en base a su conservación ó su relación con el rango de hospedador de los distintos géneros de *Rhizobium*, en genes de nodulación comunes (*nodABCDEFGHIJ*), presentes en todas las cepas de *Rhizobium* e intercambiables entre diferentes especies (Kondorosi *et al.*, 1984); genes que determinan la especificidad de hospedador (genes *hsn*), y genes que determinan la nodulación específica de un genotipo o cultivar (genes *gsn* y *csn*). Actualmente se clasifican en base a la función que tienen los productos génicos que codifican, como regulación, biosíntesis y secreción de factores Nod. Algunos genes, como *nodA*, *nodB* y *nodC*, están presentes en una sola copia, mientras que otros como *nodM*, *nodP*, *nodQ* y *nodT*, tienen secuencias homólogas en otras partes del genoma ( Rivilla y Downie, 1994; Schwedock y Long, 1989; Surin *et al.*, 1988). Como se verá más adelante, muchos de los genes de la nodulación están implicados en la biosíntesis de moléculas señal que disparan distintas respuestas en la planta relacionadas con la formación e infección del nódulo. El caso de *nodD* es especial, pues codifica para un regulador de la transcripción del resto de genes de nodulación.

En muchos casos, los genes de nodulación se encuentran cercanos unos de otros, y organizados en operones, los cuales están frecuentemente conservados en distintas especies rizobianas. (Fig. I.2). En la práctica totalidad de los casos, la secuencia promotora de los operones *nod* se encuentra conservada, incluyendo secuencias consenso denominadas cajas *nod*, de gran importancia para la regulación de la expresión génica. La caja *nod* se sitúa a

23-28 pares de bases del sitio de inicio de la transcripción en los promotores de este tipo. La secuencia conservada de la caja *nod* consiste de 47 pb, estructurada en 3 módulos de 7, 8 y 26 pb separados por 2 y 6 pb, respectivamente. Dentro de la caja *nod* se encuentra conservada una repetición invertida con la secuencia ATC-N<sub>9</sub>-GAT (Schlaman *et al.*, 1992; Györgypal *et al.*, 1991).

### 4.1. Regulación de la expresión de los genes de la nodulación

La mayoría de los genes de nodulación se expresan a niveles muy bajos cuando *Rhizobium* crece en ausencia de su planta hospedadora (Djordjevic *et al.*, 1987; Mulligan y Long, 1985; Spaink *et al.*, 1987). La inducción de la expresión de estos genes necesita de ciertos compuestos excretados por las raíces de la planta hospedadora específica. Estos son compuestos de tipo flavonoide, generalmente flavonas y flavononas, aunque en el caso de *Bradyrhizobium* se trata de isoflavonas (Schlaman *et al.*, 1992; Györgypal *et al.*, 1991). La planta también puede producir flavonoides que actúan como anti-inductores, reduciendo la expresión de los genes de la nodulación. Para la activación de la expresión se requiere además la proteína NodD, un regulador transcripcional que funciona tras interactuar con los flavonoides de la planta. La proteína NodD reconoce las secuencias conservadas en las cajas *nod*, y se une a ellas de manera permanente. La unión de NodD a la caja *nod* es independiente de flavonoides y ha sido demostrada por ensayos de unión a ADN en geles de retardo y análisis de ADN mediante “footprinting” (Fisher y Long, 1989; Goethals *et al.*, 1992; Kondorosi *et al.*, 1989; Schlaman *et al.*, 1992). Grandes deleciones de la caja *nod* eliminan o reducen fuertemente la formación del complejo, lo que indica que la interacción NodD-caja *nod* requiere todos los módulos conservados de la caja *nod* (Kondorosi *et al.*, 1989). El motivo LysR (T-N<sub>11</sub>-A) es el propuesto como el sitio diana de unión de NodD (Goethals *et al.*, 1992), ya que inserciones, deleciones o mutaciones puntuales de dicha secuencia impiden la unión de NodD a la caja *nod* de *nodA* de *S. meliloti* y *A. caulinodans* (Fisher y Long, 1993; Goethals *et al.*, 1992).

Además del complejo NodD-caja *nod*, se necesitan, salvo excepciones, flavonoides exudados por la planta. Estos son los responsables de la formación de un complejo transcripcional activo, mediante la inducción de rápidos cambios conformacionales en los complejos NodD-caja *nod*, ó mediante la interacción temporal con proteínas NodD,

causando un cambio conformacional en la proteína. En el caso de NodD3 de *S. meliloti*, lo que ocurre es que el complejo NodD-caja *nod* realiza un correcto plegamiento para la interacción con la ARN polimerasa, incluso en ausencia de moléculas inductoras. Esta hipótesis viene apoyada por las diferencias vistas tras el análisis de “footprinting” de NodD1 y NodD3 de *S. meliloti* (Fisher y Long, 1989; Kondorosi *et al.*, 1989). En *R. leguminosarum*, la proteína NodD interacciona con múltiples cajas *nod* altamente conservadas, pero no idénticas. Las diferencias estructurales en la secuencia de las cajas *nod* pueden causar una jerarquía en la activación por NodD de operones de nodulación. En aquellos *Rhizobium* que contienen varias copias de NodD, como en *S. meliloti*, todas las copias de NodD, además de SyrM, contribuyen a la activación de genes de nodulación. La concentración y estabilidad de estas proteínas, así como su competitividad y eficiencia de unión a cajas *nod*, son los principales factores que determinan la actividad del promotor (Fig. I.2).

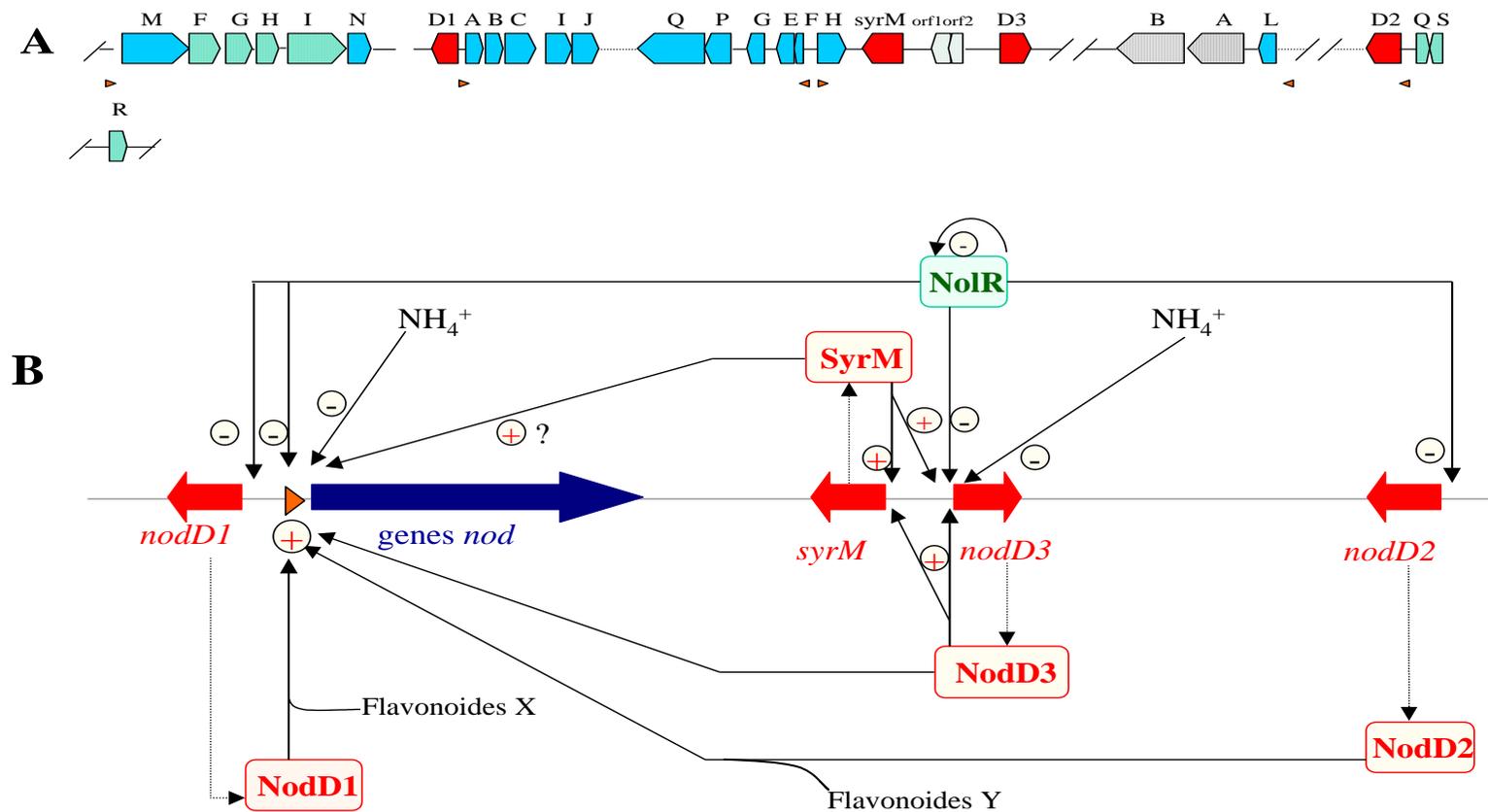
Además, la unión de flavonoides no inductores a proteínas NodD afecta a la unión de ésta a las cajas *nod*. También puede verse influenciada la interacción NodD-caja *nod* por secuencias o elementos reguladores que se encuentran aguas abajo de la caja *nod*. Por ejemplo en *S. meliloti*, la formación del complejo NodD-caja *nod* está fuertemente influenciado por la unión del represor NoIR a una secuencia de ADN adyacente a la caja *nod* (Kondorosi *et al.*, 1989) (Fig. I.2)

### 4.2. Expresión de *nodD*

En muchas especies de *Rhizobium*, el gen regulador *nodD* se transcribe de forma divergente a operones de genes *nod* regulados por él, y con frecuencia los promotores se solapan. Un posible papel de esta transcripción divergente puede ser el incremento local de ARN polimerasa para elevar los niveles de transcripción desde los promotores menos activos (Schlaman *et al.*, 1998).

La regulación y el nivel de expresión de los genes *nodD* muestran diferentes variaciones dependiendo de la especie, e incluso entre cepas de la misma especie. En general, *nodD* es expresado constitutivamente en aquellos *Rhizobium* que poseen sólo una copia de *nodD* (*R. leguminosarum* bv. *viciae* y bv. *trifolii*, *B. parasponia*, *A. caulinodans* y *M. loti*). *nodD* puede ser negativamente autorregulado por su propio producto, como en *R*

## Introducción



**FIGURA I.2. A. Organización de los genes de nodulación en *S. meliloti*.** Los genes y la dirección de su transcripción se indican con flechas anchas. ■ genes *nod*; ■ genes *nodD* y *syrM*; ■ genes *nol*; ■ genes *noe*;  orf de función desconocida; ▶ cajas *nod*. **B.- Representación esquemática de la regulación de genes de nodulación en *S. meliloti*.** Activación (+) y represión (-) de la transcripción. Adaptado de Schlaman y colaboradores (1998).



*leguminosarum* bv. *viciae* (Rossen *et al.*, 1985) y bv. *trifolii* (Spaink *et al.*, 1989). En otras especies que tienen 2 copias o más, como en *Rhizobium* sp. NGR234 ó en *R. tropici*, el único alelo de *nodD* activo también es expresado constitutivamente (Horvath *et al.*, 1987; van Rhijn *et al.*, 1993).

En *B. japonicum*, el gen *nodD1* activo, controlado por un único módulo de la caja *nod*, es expresado débilmente, pero es inducible por NodD1 en presencia de ciertos flavonoides (Smit *et al.*, 1992; Freiberg *et al.*, 1997).

En *S. meliloti*, cada una de las 3 copias de *nodD* es regulada de forma diferente. Las tres copias de *nodD*, junto a *syrM*, forman una compleja red autorreguladora (Fig. I.2.B). La expresión de *nodD3* parece estar regulada positivamente por su propio producto, por SyrM y por NodD1 (Kondorosi *et al.*, 1991; Maillet *et al.*, 1990; Mulligan y Long, 1989; Rushing *et al.*, 1991). Pero hay datos que muestran que la expresión de *nodD3* es estimulada por luteolina (Dusha *et al.*, 1989), por NodD1 y NodD3 (Maillet *et al.*, 1990). En contradicción con esto, Swanson y colaboradores (1993) no detectan una autorregulación positiva por NodD3, ni una inducción por luteolina y NodD1.

La expresión de *nodD3* es reprimida por altos niveles de nitrógeno combinado (Dusha *et al.*, 1989; Dusha y Kondorosi, 1993). Recientemente se ha sugerido que NtrC es capaz de reconocer secuencias adyacentes al promotor de *nodD3* (Dusha *et al.*, 1999).

La transcripción de *nodD1* y *nodD2* es aparentemente constitutiva, si bien está regulada negativamente por *nolR* (Kondorosi *et al.*, 1989). Este gen está presente en una sola copia en el cromosoma de todas las cepas de *S. meliloti* y codifica para una proteína represora, NoIR, si bien el producto no parece ser activo en todas las cepas analizadas (Kondorosi *et al.*, 1991). Esta proteína reprime la expresión de *nodD1* y *nodD2* y de otros genes *nod* (p.e. *nodABC*) uniéndose a una secuencia específica situada entre la caja *nod* y el sitio inicio de la transcripción. Inductores de genes de nodulación, como la luteolina, tienen un efecto negativo en la formación del complejo NoIR-ADN. La luteolina promueve la formación de complejos NodD-caja *nod* y de ese modo disminuye la unión de NoIR al promotor, liberándose sitios de unión para la RNA polimerasa (Kondorosi *et al.*, 1989, 1991). *nolR* también ha sido identificado en *R. leguminosarum*, y su producto posee una actividad similar a NoIR de *S. meliloti* (Kiss *et al.*, 1998). Las cepas que poseen una proteína NoIR activa presentan una mayor eficacia de nodulación, lo que indica que un

control fino de la expresión de los genes de nodulación, tanto por factores positivos como negativos, permite una óptima nodulación de la planta hospedadora.

### 4.3. La proteína NodD

Las proteínas NodD funcionan como activadores transcripcionales de los genes de nodulación que están por debajo de las cajas *nod*. NodD pertenece a la familia LysR de proteínas (Schell *et al.*, 1993), dentro de la cual se encuentran proteínas de unión a ADN, que en muchos casos funcionan como activadores transcripcionales.

Generalmente las proteínas NodD requieren moléculas señal excretadas por la planta, flavonoides, que actúan como coinductores en la regulación de la transcripción de genes de nodulación, excepto NodD3, que no necesita inductores y cuya actividad está regulada a nivel de expresión génica. Aunque no ha sido probado físicamente, existen evidencias indirectas de que NodD interacciona directamente con las moléculas inductoras. Cada proteína NodD responde a un tipo característico de flavonoides, respuesta que se traduce en altos niveles de transcripción de los genes de nodulación inducibles (Horvath *et al.*, 1987, Spaink *et al.*, 1987, Zaat *et al.*, 1987). Por esta razón, NodD es un determinante de la especificidad de nodulación del hospedador. Por ejemplo, NodD1 de *Rhizobium* sp. NGR234 responde a un amplio espectro de flavonoides mientras que la luteolina y la 7,4'-dihydroxiflavona son los únicos flavonoides capaces de inducir genes *nod* de *R. leguminosarum* bv. trifolii (Bassam *et al.*, 1988).

Cuando la proteína NodD es activada por flavonoides, sufre un cambio conformacional que conlleva la activación del promotor y el inicio de la transcripción por la ARN polimerasa. Esto viene apoyado por el hecho de que ciertos mutantes e híbridos de proteínas NodD (proteínas NodD-FITA, Flavonoid-Independent-Transcription-Activation) no necesitan de la presencia de flavonoides para la activación de genes de nodulación (Burn *et al.*, 1987; Spaink *et al.*, 1989). Las proteínas NodD se dividen en dos dominios funcionales, uno para la percepción de los flavonoides, y otro para la unión al ADN. Las moléculas inductoras parecen ser percibidas por la parte carboxilo terminal (C-terminal) de la proteína (Spaink *et al.*, 1989), la cual diferencia a unas proteínas NodD de otras, ya que la homología de la parte amino terminal (N-terminal) de las proteínas NodD es muy alta. Los resultados con dobles mutantes de NodD (Burn *et al.*, 1989) y con proteínas NodD

híbridas sugieren además que ciertos aminoácidos localizados en distintos sitios de la proteína son necesarios para la interacción con los flavonoides.

La proteína NodD, además de funcionar como activador transcripcional, puede actuar como represor de la expresión génica. Esto ocurre en la autorregulación negativa de *nodD* en *R. leguminosarum* bv. *viciae* y bv. *trifolii*, y en la expresión de *rhiA*, la cual es reprimida por NodD. Hu *et al.*, (2000) han sugerido que la autorregulación de *nodD* se debe a la competencia entre NodD y la propia ARN polimerasa por sus respectivos sitios de unión al ADN, que solapan parcialmente. En otros casos, NodD puede actuar, directa o indirectamente, reprimiendo la expresión de genes de la nodulación. Es el caso de NodD2 de *Rhizobium* sp. NGR234, que interacciona con el promotor de *nodABC* reprimiendo su expresión (Fellay *et al.*, 1998), o de NodD2 de *B. japonicum*, que parece reprimir la expresión de genes *nod* a través del control de la expresión de otro regulador, *nolA* (García *et al.* 1996).

#### 4.4. Otros elementos reguladores de la expresión de genes de la nodulación

En *B. japonicum* la transcripción de los genes de nodulación también puede ser inducida por isoflavonas mediante un sistema alternativo compuesto por los genes *nodVW* (Sanjuan *et al.*, 1994). NodV y NodW muestran homología con proteínas pertenecientes a la familia de sistemas reguladores de dos componentes (Göttfert *et al.*, 1990). NodV es una proteína de membrana que actúa como sensor de isoflavonas distintas de los que interactúan con NodD1. En respuesta a la presencia de las moléculas inductoras, NodV se fosforila, y activa a NodW mediante la transferencia del grupo fosfato. La fosforilación de NodW es esencial para la activación de la transcripción de los genes *nod*. En ausencia de un represor, NodW en su forma activa es capaz por sí sola de llevar a cabo la activación de la transcripción, mientras que cuando dicho represor está presente, la misma acción requiere simultáneamente NodW y NodD1. Este sistema permite la ampliación del rango de hospedador de *B. japonicum* a plantas como *Vigna* y *Macroptilium* (Stacey, 1995).

En ciertos rizobios, como *S. meliloti* o *Rhizobium* sp. NGR234, existen una o más copias de *syrM*, gen que codifica para una proteína perteneciente a la familia LysR de reguladores transcripcionales, cuya actividad afecta directa o indirectamente a la expresión de genes de nodulación. En *S. meliloti*, SyrM es una proteína reguladora que además de

estar implicada en la producción de polisacáridos extracelulares (Mulligan y Long, 1989; Dusha *et al.*, 1999), en presencia de NodD3 permite la expresión de los genes *nod* de forma independiente a flavonoides. Parece que *nodD3* y *syrM* representan un circuito autoamplificable por el que regulan su propia expresión y con ello la expresión de otros genes *nod* (Fig. I.2). Además, cuando se sobreexpresa SyrM se extiende el rango de hospedador (Kondorosi *et al.*, 1991a) y se sintetizan factores Nod con un ácido graso distinto (Demont *et al.*, 1994). Existen datos que sugieren funciones adicionales para esta proteína. A diferencia de los genes *nodD*, que apenas se expresan en células que están llevando a cabo la fijación de N<sub>2</sub>, *syrM* se expresa en bacteroides, incluso a niveles superiores a los que se detectan en vida libre. Se ha identificado un gen, *syrB*, que podría estar implicado en la represión de *syrM* en condiciones aeróbicas (Barnett y Long, 1997).

### 4.5. Factores adicionales que modulan la expresión de genes de la nodulación

La formación del nódulo está influenciado por numerosos factores ambientales. Entre los más importantes están el pH y factores asociados con la acidez del suelo. La sensibilidad a la acidez es muy pronunciada durante los primeros estadios de la simbiosis, especialmente antes y durante la formación de la curvatura de pelos radicales. La influencia del pH sobre la inducción de genes de nodulación se manifiesta de distintas maneras: (i) Pobre crecimiento de *Rhizobium* a bajo pH; (ii) Baja producción de flavonoides inductores por parte de la planta en suelos de bajo pH; (iii) La acumulación de flavonoides inductores en la bacteria está influenciada por el pH.

También los altos niveles de nitrógeno combinado tienen efectos negativos en la producción y excreción de compuestos fenólicos por la raíz, lo cual puede ser un factor limitante para la inducción de genes de la nodulación y para el establecimiento de la simbiosis (Kapulnik *et al.*, 1987). En *S. meliloti* y *B. japonicum* la expresión de muchos genes *nod* está controlada por los niveles de nitrógeno combinado. En *S. meliloti* la regulación por amonio de los genes *nodABCIIJ* y *nodD3*, pero no de *nodD1*, es llevada a cabo por el sistema regulador general del nitrógeno (*ntr*), además del gen cromosómico *ntrR* (Dusha *et al.*, 1989, 1999). El nivel de nitrógeno es percibido por el sistema Ntr, el cual transmite una señal a *syrM* y *nodD3* a través de las proteínas reguladoras NtrA y NtrC. La represión de los genes de nodulación a altas concentraciones de amonio es

llevada a cabo por NtrR (Dusha y Kondorosi, 1993). Por el contrario, en *B. japonicum* la represión por amonio de los genes *nodD1* y *nodYABC* parece independiente de NtrC (Wang y Stacey, 1990).

#### 4.6. Expresión de los genes de la nodulación durante las etapas tardías de la simbiosis

La expresión de genes de nodulación inducibles ha sido detectada durante el proceso de invasión, en los cordones de infección y en la zona de infección de los pelos radicales, pero esta expresión decae rápidamente durante el proceso de diferenciación en bacteroides en la zona central del nódulo, desapareciendo totalmente en la zona de senescencia (Cren *et al.*, 1995; Freiberg *et al.*, 1997; Schlaman *et al.*, 1991). En el caso de *Rhizobium* sp. NGR234, NodD2 podría estar implicado en la represión de genes de la nodulación en los bacteroides (Fellay *et al.*, 1998).

### 5. FUNCIONES DE LOS GENES DE LA NODULACIÓN

La activación de los genes *nod* por el complejo flavonoides-NodD-caja *nod* tiene como resultado la biosíntesis de proteínas implicadas en la producción y excreción de moléculas señal que desempeñan un papel crucial en las primeras etapas de la nodulación. Estas moléculas señal son lipo-quitina-oligosacáridos (LCOs), también denominados Factores Nod, los cuales inducen diversas respuestas en la raíz: deformación de pelos radicales, inducción de la expresión de genes de nodulinas, iniciación del cordón de infección y formación del primordio nodular.

La estructura básica de los factores Nod es la misma en todos los rizobios y consiste de un esqueleto oligosacárido formado por moléculas de N-acetilglucosamina, unidas por enlaces  $\beta$ -1,4. (Fig. I.3). La longitud del esqueleto oligosacárido varía, dependiendo de la especie de *Rhizobium*, entre 2 y 5 residuos de N-acetilglucosamina. A diferencia de los oligómeros de quitina, los factores Nod presentan en su extremo no reductor un ácido graso de longitud y saturación variable. Además, puede llevar distintos sustituyentes (grupos sulfato, metilo, acetilo, carbamilo, e incluso unidades de fucosa, arabinosa), tanto en el extremo reductor como en el no reductor, que varían dependiendo

de la especie de *Rhizobium* (Fig. I.4). Esta distinta "decoración" es el principal determinante en la especificidad de *Rhizobium* por su hospedador (Denarié *et al.*, 1996).

### 5.1. Biosíntesis de la estructura básica del factor Nod

Para la biosíntesis de la estructura básica de los factores Nod se requiere NodA, NodB y NodC (Fig. I.3). Esta biosíntesis es común para todos los *Rhizobium*, produciéndose una estructura mínima que tiene actividad biológica y que puede inducir la deformación de pelos radicales (Spaink *et al.*, 1991b). NodC es una N-acetilglucosamina transferasa que cataliza la formación del esqueleto del quito-oligosacárido por la incorporación de UDP-N-acetilglucosamina a quito-oligosacáridos (Geremia *et al.*, 1994; Kamst *et al.*, 1995; Spaink *et al.*, 1994; Roche *et al.*, 1996). La proteína NodC determina además la longitud del esqueleto, de la que depende, en parte, el rango de hospedador de la bacteria. La siguiente etapa es la unión de un ácido graso al residuo de glucosamina no reductor. Para esto se requiere de la acción de NodB y NodA (Figura I.3). NodB, una desacetilasa, elimina el grupo acetilo del extremo no reductor (John *et al.*, 1993), mientras que NodA, una aciltransferasa, lo reemplaza por un ácido graso (Röhrig *et al.*, 1994; Atkinson *et al.*, 1994; Mergaert *et al.*, 1995). La proteína NodA de cada rizobio puede añadir un ácido graso diferente, por lo que esto también supone un factor en la especificidad de hospedador (Ritsema *et al.*, 1996; Debellé *et al.*, 1996; Peters, 1997).

### 5.2. Modificaciones de los factores Nod

Como se muestra en la figura I.4, diversos sitios en el esqueleto quito-oligosacárido son susceptibles de llevar distintos sustituyentes, siendo estas "decoraciones" los mayores determinantes de especificidad de hospedador en la interacción *Rhizobium*-leguminosa. De esta forma, los residuos glucosídicos y la cadena de ácidos grasos pueden ser modificados ó sustituidos por la acción de otras proteínas implicadas en la producción de factores Nod, las cuales pueden ser específicas de algunas especies.

Existe una correlación entre el tipo de leguminosa nodulada y la presencia ó ausencia de ácidos grasos poli-insaturados en la estructura del factor Nod. Así, los rizobios

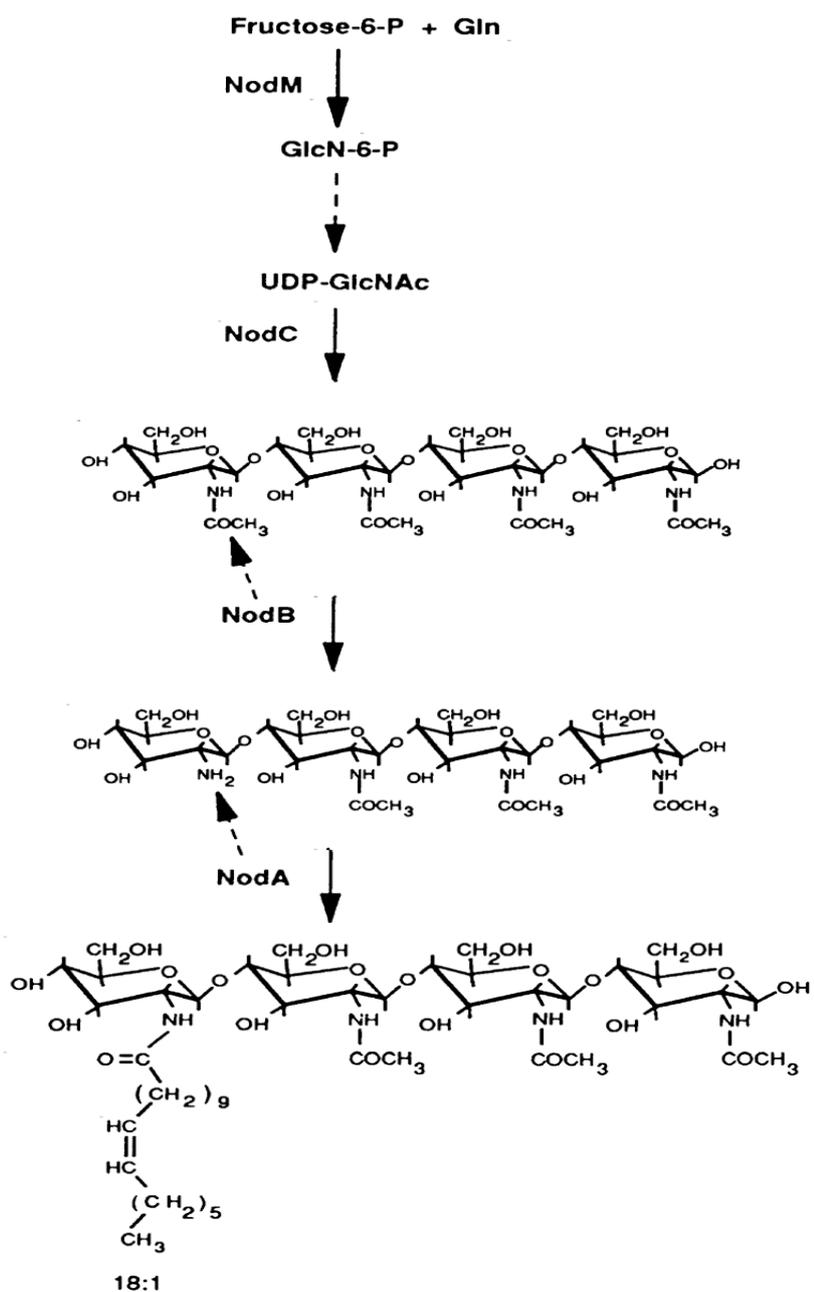


FIGURA I.3. Biosíntesis de la estructura “mínima” del factor Nod. Tomado de Downie (1998).



que nodulan leguminosas que forman nódulos de tipo determinado producen generalmente factores Nod con ácidos grasos saturados o mono-insaturados, mientras que la formación de nódulos indeterminados requiere factores Nod con ácidos grasos con mayor grado de insaturación. Estos ácidos grasos pueden proceder de la ruta general de síntesis de ácidos grasos (Geiger *et al.*, 1994), ó pueden ser sintetizados por enzimas específicas, como el caso de NodFE (Spaink *et al.*, 1991b, 1995b; Demont *et al.*, 1993; Bloemberg *et al.*, 1995; Van der Drift *et al.*, 1996).

Una modificación frecuente en la posición amino (-N) del extremo no reductor es la introducción de un grupo metilo, llevado a cabo por NodS (Geelen *et al.*, 1993; Jabbouri *et al.*, 1995), el cual se ha visto que está ausente en aquellas cepas que tienen *nodF* y *nodE*, por lo que *nodS* también juega un papel en la especificidad de hospedador. Otras modificaciones en el extremo no reductor de la molécula son producidas por NodL en *S. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *B. japonicum* y *B. elkani*, que incorpora un grupo O-acetilo al C6 (Downie *et al.*, 1989; Bloemberg *et al.*, 1994, 1995), o por NodU, que está involucrada en la incorporación de un grupo carbamilo en la posición C6 en algunas especies de *Rhizobium* (Jabbouri *et al.*, 1995; Geelen *et al.*, 1993; D'Haese *et al.*, 1999).

La posición más frecuentemente sustituida es la posición C6 del extremo reductor del esqueleto de quitina. Estas sustituciones son muy importantes en la especificidad de hospedador, pudiendo ser de tres tipos:

- Sulfatación: los productos de los genes *nodH*, *nodP* y *nodQ* son los encargados de llevar a cabo de forma coordinada esta sulfatación, la cual es fundamental en la especificidad de hospedador, ya que la presencia de un grupo sulfato juega un papel clave en el reconocimiento de factores Nod por algunas leguminosas, como *Medicago spp.* (Roché *et al.*, 1991; Journet *et al.*, 1994). NodP y NodQ producen formas activas de sulfato, y la sulfotransferasa NodH transfiere estos grupos sulfato a los factores Nod.
- Acetilación: NodX, presente en algunas cepas de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, es una O-acetiltransferasa que coloca un grupo O-acetilo en esta posición del factor Nod (Firmin *et al.*, 1993). Esta modificación es la responsable de que ciertas cepas de *R. leguminosarum* bv. *viciae* puedan nodular el cultivar Afganistán de guisante.

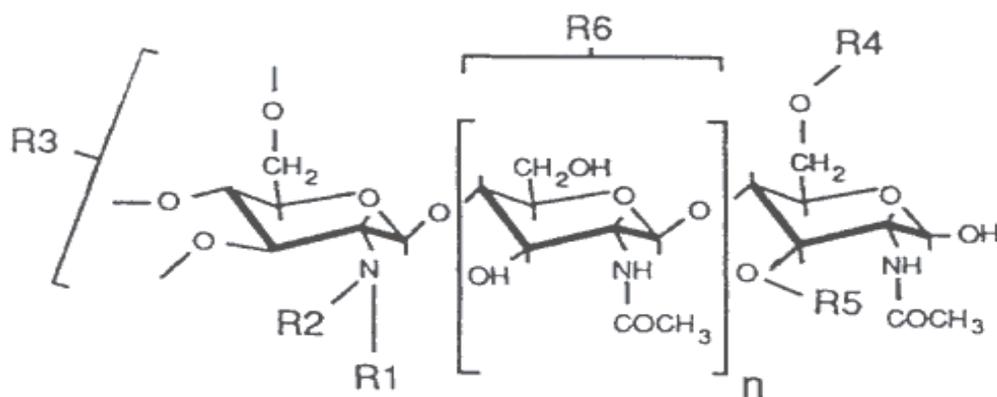
Glicosilación: diferentes grupos fucosilo (metilfucosa, acetilfucosa,

acetilmetilfucosa y sulfatometilfucosa) pueden ser sustituyentes en la posición C6 en distintas cepas de *Rhizobium* gracias a NodZ, una fucosiltransferasa (Stacey *et al.*, 1994; Fellay *et al.*, 1995; López-Lara *et al.*, 1996; Mergaert *et al.*, 1996; Quinto *et al.*, 1997). En el caso de *R. etli* y *M. loti*, la acetilación de la fucosa es llevada a cabo por NodL después de la incorporación del azúcar al factor Nod (Corvera *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 1996). También se han caracterizado residuos de arabinosa en la posición C3 del extremo reductor de factores Nod producidos por *A. Caulinodans* ORS571, e incluso la presencia simultánea de arabinosa y fucosa como sustituyentes en la acetilglucosamina reductora (Mergaert *et al.*, 1997). También se han detectado grupos glicerol unidos al C1 del extremo reductor de factores Nod de *Bradyrhizobium* (Carlson *et al.*, 1993; Luka *et al.*, 1993)

### 5.3. Transporte y secreción de factores Nod

Los factores Nod sintetizados en el interior de la bacteria son transportados al exterior gracias a los productos de los genes *nodIJ* (Mckay y Djordjevic, 1993; Spaink *et al.*, 1995b; Cárdenas *et al.*, 1996). Las proteínas NodI y NodJ son similares a proteínas de secreción dependientes de ATP. No obstante, mutantes *nodIJ* tienen pocos efectos en la secreción de factores Nod y en el fenotipo simbiótico, lo cual sugiere la existencia de sistemas de transporte alternativos (Spaink *et al.*, 1995b)

La proteína NodT está relacionada con la familia de proteínas de membrana externa que se encargan de la secreción de sustratos a través de las membranas externa e interna. Por analogía con estos sistemas de secreción, se ha sugerido que NodT puede formar parte del sistema de secreción de factores Nod, junto con NodI y NodJ. Además, NodT permite a cepas de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* nodular el cultivar Woolgenellup (Lewis-Henderson y Djordjevic, 1991), lo que sugiere que el transporte de los factores Nod también pueda tener un efecto en la especificidad de hospedador.



Especie Rizobiana	DECORACIONES DEL FACTOR NOD						
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	n*
<i>S. meliloti</i>	H	C16:2, C16:3 C18:C26(ω-1)OH	Ac(C-6), H	S	H		1,2,3
<i>R. l. bv. viceae</i>	H	C18:1, C18:4	Ac(C-6)	H	H		2,3
<i>R. l. bv. trifolii</i>	H	C18:1, C18: C20:3, C20:4	Ac(C-6)	H	H		1,2,3
<i>M. loti</i>	Me	C18:1	Cb(C-4)	AcFuc	H		3
	H	C18:1, C18	Cb(C-3)	Fuc	H	Fuc	3
<i>R. etli</i>	Me	C18:1	Cb(C-4) H	AcFuc	H		3
<i>S. fredii</i>	H	C18:1	H	MeFuc, Fuc	H	Glc	1,2,3
<i>B. japonicum</i>	H	C18:1	H	MeFuc	H		3
<i>A. caulinodans</i>	H	C18:1	Cb(C-6)	Fuc, H	D-Ara, H		2,3

**FIGURA I.4. Ejemplos de la estructura básica y de las diferentes decoraciones de los factores Nod.** Adaptado de Downie (1998)



**Tabla I.3. Principales genes de nodulación y sus funciones.** Ac, *Azorhizobium caulinodans*; Bj, *Bradyrhizobium japonicum*; Re, *Rhizobium etli*; Sf, *Sinorhizobium fredii*; Rlt, *R. leguminosarum* bv. trifolii; Rlv, *R. leguminosarum* bv. viciae; Rn, *Rhizobium sp.*; Sm, *Sinorhizobium meliloti*; Rt, *Rhizobium tropici*.

Gen	Función del producto génico	Especies
<i>nodA</i>	Aciltransferasa	Todas
<i>nodB</i>	N-desacetilasa	Todas
<i>nodC</i>	quitín sintasa	Todas
<i>nodD</i>	Regulador	Todas
<i>nodE</i>	β-cetoacil sintasa	Sm, Rlv, Rlt
<i>nodF</i>	Transportador de grupos acilo	Sm, Rlv, Rlt
<i>nodG</i>	Deshidrogenasa ?	Sm
<i>nodH</i>	Sulfotransferasa	Sm, Rt, Rn
<i>nodI</i>	Transportador de factores Nod	Todas
<i>nodJ</i>	Transportador de factores Nod	Todas
<i>nodL</i>	O-acetil transferasa	Rlv, Rlt, Sm
<i>nodM</i>	Glucosamina sintetasa	Sm, Rlt, Rlv
<i>nodN</i>	Síntesis del factor Nod ?	Sm, Rlv
<i>nodO</i>	Proteína secretada	Rlv
<i>nodP</i>	ATP- sulfurilasa, APS- kinasa	Sm, Rt
<i>nodQ</i>	ATP -sulfurilasa, APS- kinasa	Sm, Rt
<i>nodS</i>	N-metil transferasa	Rn, Rt, Ac, Bj, Sf
<i>nodT</i>	Proteína de membrana externa	Rlv, Rlt
<i>nodU</i>	Carbamilación	Bj
<i>nodV</i>	Componente regulador	Bj
<i>nodW</i>	Componente regulador	Bj
<i>nodX</i>	O-acetil transferasa	Rlv
<i>nodZ</i>	Fucosil transferasa	Ac, Rn, Re
<i>nolA</i>	Regulador	Bj
<i>nolB</i>	Sistema de secreción	Rn, Sf
<i>nolR</i>	Represor de genes <i>nod</i>	Sm, Rlv
<i>nolT</i>	Sistema de secreción?	Sf, Rn
<i>nolU</i>	Sistema de secreción?	Sf, Rn
<i>nolV</i>	Sistema de secreción?	Sf, Rn
<i>nolW</i>	Sistema de secreción?	Sf, Rn
<i>nolX</i>	Sistema de secreción?	Sf, Rn
<i>noeA</i>	Metiltransferasa?	Sm
<i>noeE</i>	Sulfatación de fucosa	Rn
<i>noeI</i>	Metil transferasa	Rn

### 5.4. Genes de nodulación no implicados en la biosíntesis de factores Nod

Existen ejemplos de genes de nodulación que no parecen intervenir en la biosíntesis de factores de nodulación (Tabla I.3). Tal es el caso de los genes *nolXWBTUV* de *S. fredii*. Mutaciones en estos genes permiten la nodulación de ciertos cultivares de soja que no pueden ser nodulados por la cepa silvestre (Meinhardt *et al.*, 1993). La hipótesis propuesta es que estos genes estarían implicados en la secreción de proteínas que bloquean la nodulación, de ahí el fenotipo simbiótico que presentan estos mutantes. Otro ejemplo notable es el de *nodO* de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. NodO es una proteína de unión a calcio (De Maagd *et al.*, 1989; Economou *et al.*, 1994) no implicada en la biosíntesis, transporte o unión a factores Nod (Spaink *et al.*, 1991a; Sutton *et al.*, 1994), pero que estimula la nodulación en mutantes *nodE*, por lo que se ha sugerido que esta proteína podría modificar el flujo de iones en la membrana de la célula vegetal, aumentando los efectos de los factores Nod (Sutton *et al.*, 1994).

### 5.5. Respuestas de la planta inducidas por los Factores Nod

El resultado de la detección de los factores de nodulación bacterianos por su planta hospedadora específica y los consiguientes cambios en la expresión génica, es la inducción de una serie de cambios morfológicos que preparan y facilitan la entrada de la bacteria en la planta. La acción de los factores Nod puede ser detectada poco después de la incubación de las raíces vegetales con concentraciones de factores Nod del orden de  $10^{-12}$ M.

Las primeras respuestas observadas después de la aplicación de los factores Nod a raíces de plantas leguminosas son la despolarización de la membrana plasmática de células epidérmicas (Ehrhardt *et al.*, 1992; Felle *et al.*, 1995; Kurkdjian, 1995), alcalinización de los pelos radicales, cambios en la concentración de calcio intracelular y en el flujo de protones (Ehrhardt *et al.*, 1996), reordenaciones de los filamentos de actina (Allen *et al.*, 1994) y un incremento de la corriente citoplasmática del pelo radical (Heidstra *et al.*, 1994).

Existe una correlación entre la respuesta temprana del pelo radical a los factores Nod y alteraciones en la concentración de calcio. Esto está asociado a la recuperación de la polaridad citoplasmática celular y a la reorganización del citoesqueleto, propia de procesos de exocitosis y crecimiento polar como los descritos durante el desarrollo de los pelos radicales y del tubo polínico (Miller *et al.*, 1997; Trewavas y Malhó, 1998; Yang, 1998).

Se ha sugerido la implicación del calcio como segundo mensajero en la cadena de señalización del factor de nodulación (Ehrhardt *et al.*, 1996).

La susceptibilidad de los pelos radicales a los factores Nod depende de su estadio de desarrollo (Hadri y Bisseling, 1998), produciéndose la deformación fundamentalmente en aquellos pelos jóvenes que se encuentran en estado activo de crecimiento. Factores Nod en concentraciones del rango de nanomolar son suficientes para inducir la deformación del pelo radical (Lerouge *et al.*, 1990; Spaink *et al.*, 1991b; Price *et al.*, 1992; Sanjuan *et al.*, 1992; Schultze *et al.*, 1992; Mergaert *et al.*, 1993; Heidstra *et al.*, 1994), aunque en general se necesita la presencia del rizobio para producir su curvatura (Relic *et al.*, 1993). La deformación comienza con un engrosamiento de la punta del pelo radical, lo cual ocurre dentro de la primera hora después de la aplicación de los factores Nod, seguido de la formación de una nueva zona de crecimiento sobre la zona apical engrosada.

En respuesta a la inducción por factores Nod, las plantas leguminosas expresan genes denominados genes tempranos de nodulación (genes ENOD), los cuales están implicados en las etapas iniciales de la nodulación, si bien algunos pueden expresarse también durante el proceso de infección.

Los factores Nod inducen la expresión de diversos genes en la epidermis radical. Por ejemplo, ENOD5, ENOD12, Mtrip1 y VsLb1 aparecen poco tiempo después de la aplicación de los factores Nod. Estas nodulinas tempranas parece que juegan un papel muy importante en el desarrollo del nódulo (Denarié *et al.*, 1996; Long, 1996). Así, ENOD5 y ENOD12, que codifican para proteínas ricas en prolina, podrían ser componentes de la pared del cordón de infección (Scheres *et al.*, 1990), mientras que Mtrip1, que codifica para una peroxidasa, se cree que puede facilitar la infección al contribuir a la reparación de la pared celular en el sitio de infección (Cook *et al.*, 1995).

Además de las respuestas inducidas en la epidermis radical, los factores Nod inducen otra serie de respuestas a nivel del córtex y del periciclo. Paralelamente con la formación del cordón de infección, las células corticales son mitóticamente reactivadas, formando el primordio nodular. Los cordones de infección crecen hacia estos primordios, y una vez allí la bacteria es liberada en el citoplasma de la célula hospedadora. El tipo de células del córtex que se dividen viene determinado por el tipo de leguminosa y por la capa del córtex de la que se trate. En leguminosas de tipo tropical, que forman nódulos de tipo determinado, se dividen las células del córtex externo, mientras que en leguminosas con

nódulos de tipo indeterminado, son las células del córtex interno las que se dividen. Durante esta reactivación de las células corticales por los factores Nod, se induce la expresión de genes que controlan el ciclo celular, como *cdc2* y ciclinas mitóticas (Yang *et al.*, 1994). Genes de nodulinas, como ENOD12, Gm93, ENOD40 y MtPRP4 son expresados en todas las células del primordio (Scheres *et al.*, 1990, Kouchi *et al.*, 1993, Yang *et al.*, 1993, Asad *et al.*, 1994, Matvienko *et al.*, 1994, Wilson *et al.*, 1994), mientras que ENOD5 solo se expresa en células que contengan rizobios.

Al mismo tiempo los factores Nod inducen también otra serie de respuestas en el córtex radical como la formación del cordón de pre-infección. El cordón de pre-infección está constituido por células del córtex externo que han sufrido una serie de cambios: el núcleo migra hacia el centro de las células, el citoplasma y los microtúbulos se reordenan para formar puentes citoplasmáticos que se orientan de forma radial (van Brussel *et al.*, 1992). El canal de infección atravesará estas células corticales a través de dichos puentes citoplasmáticos. La presencia cercana de un cordón de infección determina la modificación local de la pared celular en los extremos del puente citoplasmático, y finalmente, la degradación de la misma, permitiendo al cordón de infección pasar de una célula a otra en dirección a las células del córtex interno.

Por otra parte, se hipotetiza que la división de células corticales puede estar negativamente regulada por un gradiente de etileno dirigido por la ACC oxidasa (actividad que permite la formación de etileno) (Heidstra *et al.*, 1997). Esto coincide con el hecho de que cuando se inhibe la síntesis de etileno, se produce un incremento del número de primordios nodulares localizados en los polos del floema, que es donde se localiza la ACC oxidasa (Heidstra *et al.*, 1997). Además, mutantes de *M. truncatula* insensibles a etileno se caracterizan por presentar un mayor porcentaje de cordones de infección que son capaces de penetrar dentro de células corticales. Este alto número de infecciones parece estar correlacionado con el mayor número de primordios nodulares formados en el córtex interno. Este fenotipo se reproduce en plantas silvestres de *M. truncatula* tratadas con inhibidores de la síntesis de etileno (Penmetza *et al.*, 1997). Este mecanismo de regulación negativa via etileno pudiera estar controlado por los factores Nod, ya que éstos son capaces de inducir una serie de respuestas relacionadas con etileno en las raíces de *Vicia sativa* (Van Spronsen *et al.*, 1995). Por ejemplo, los factores Nod pueden inducir la formación de raíces cortas y engrosadas (fenotipo Tsr), efecto causado por una excesiva producción de

etileno en respuesta a factores Nod cuando las raíces son expuestas a la luz, y que puede ser reprimido por inhibidores de la síntesis de etileno.

La aplicación de auxinas y citoquininas en raíces de guisante favorece la división de células corticales, aunque es necesaria también la presencia de un factor presente en los haces vasculares, la uridina (Smit *et al.*, 1995). Se postula que un gradiente opuesto de auxinas y citoquininas, así como un descenso del gradiente de uridina desde los haces vasculares hasta el córtex externo determina qué células del cortex son reactivadas mitóticamente. En *M. sativa*, la adición exógena de citoquininas induce la expresión de muchos genes de nodulinas tempranas (Muñoz *et al.*, 1996), incluida ENOD40, y la activación de la división de células del cortex interno bajo condiciones de limitación de nitrógeno (Bauer *et al.*, 1996). La capacidad de nodulación de mutantes de *S. meliloti* defectivos en la síntesis de factores Nod es parcialmente recuperada por la producción de citoquininas por la bacteria (Cooper *et al.*, 1994). En plantas transgénicas de trébol se ha demostrado que los factores Nod y quitín-oligosacáridos actúan durante las etapas más tempranas de la formación del nódulo gracias a la perturbación del flujo de auxina en las raíces, pudiendo los flavonoides mediar en esta respuesta (Mathesius *et al.*, 1998). Estos resultados indican que los factores Nod y las rutas de señalización de las citoquininas pueden usar elementos comunes, y que los factores Nod pueden inducir la división celular gracias a cambios en el flujo hormonal.

Durante las primeras etapas de la simbiosis no tienen lugar cambios citológicos en el periciclo, pero sí se produce la expresión de la nodulina temprana ENOD40, que se expresa en la región del periciclo opuesta a donde las células corticales se van a dividir (Kouchi *et al.*, 1993, Yang *et al.*, 1993, Asad *et al.*, 1994).

Además de su papel directo en el proceso de infección y nodulación, los factores Nod parecen estar involucrados en la evitación de los mecanismos de defensa de la planta. Martínez-Abarca y col. (1998) sugieren que factores Nod compatibles, es decir aquellos sintetizados por rizobios que específicamente son capaces de nodular las raíces de una leguminosa, podrían inhibir la síntesis de ácido salicílico (SA), importante molécula implicada en mecanismos de defensa de la planta, o evitar el reconocimiento de éste por la planta, ya que la producción de factores Nod específicos suprime la acumulación de SA inducido por la bacteria, lo cual es importante para la formación del primordio nodular.

### 5.6. Relación estructura-función de los Factores Nod. Mecanismos de percepción

La longitud de la cadena oligosacáridica y las decoraciones presentes en el factor Nod determinan el tipo de respuesta que induce en plantas leguminosas. Por ejemplo, para la alcalinización del citoplasma de pelos radicales, sólo se requiere su estructura básica: un esqueleto de quitina con una cadena de ácido graso, pero ni la estructura del ácido graso ni la longitud de la quitina son importantes. Para la deformación del pelo radical y la activación de la expresión de ENOD12, la longitud y nivel de insaturación del ácido graso no es muy importante, aunque es necesaria la presencia de un ácido graso y del grupo sulfato. Para la despolarización de la membrana plasmática y la formación del canal de pre-infección, la estructura del ácido graso y la presencia del grupo O-acetilo en el extremo reductor son muy importantes. Así, la inducción de la despolarización por parte de NodRm-IV (C18:1,S) es mucho menor que la producida por NodRm-IV (C16:2,S) (Felle *et al.*, 1995 ). También cepas *nodL*, que secretan factores Nod que carecen de grupo O-acetilo, pierden la capacidad para inducir la formación de cordones de infección (Ardourel *et al.*, 1994 ).

Las sustituciones sobre el extremo reductor de la molécula pueden tener también efectos drásticos sobre la capacidad de inducir respuestas en la epidermis. Por ejemplo, la desulfatación del factor NodRm reduce 1000 veces su actividad para inducir deformación en el pelo radical, la expresión de ENOD12 y la despolarización de la membrana de células radicales de alfalfa (Journet *et al.*, 1994; Felle *et al.*, 1995). Así, mutantes NodH<sup>-</sup> de *S. meliloti*, que producen factores Nod no sulfatados, son incapaces de inducir la formación del cordón de infección en alfalfa (Roche *et al.*, 1991).

La baja concentración a la que los factores Nod inducen respuestas en la raíz de la planta ( $10^{-12}$  M), apunta a que estas moléculas deben de ser percibidas por un receptor, que reconocería tanto la longitud del lipo-quitino-oligosacárido (LCO) como los sustituyentes en el extremo reductor. El hecho de que las diferentes respuestas inducidas por los factores Nod tengan diferentes requerimientos estructurales, condujo a Ardourel *et al.* (1994) a postular sobre la existencia de al menos dos receptores en la epidermis:

- Receptor de señal, poco selectivo en el reconocimiento de los factores Nod, que estaría implicado en la deformación de los pelos radicales y expresión génica.

- Receptor de entrada, que reconoce solo factores Nod con una estructura muy específica e involucrado en la formación del canal de infección.

Esta hipótesis viene apoyada por casos como el de mutantes *sym2* de guisante Afghanistan. *sym2* es el alelo responsable de que cepas europeas de *R. leguminosarum* bv. *viciae* sean incapaces de nodular la variedad Afghanistan de guisante. Esta variedad de guisante sólo puede ser nodulada por cepas que contengan el gen *nodX* (Davis *et al.*, 1988), gen que codifica para una acetiltransferasa, la cual produce una acetilación en el factor Nod (Firmin *et al.*, 1993). Aquellas cepas que carecen de *nodX* inducen deformación de pelos radicales, pero están limitadas en su capacidad para formar canales de infección. Esto sugiere que *sym2* está involucrado en el reconocimiento de factores Nod modificados por NodX (Heidstra *et al.*, 1993).

Los estudios bioquímicos y genéticos sugieren la existencia de múltiples receptores de LCOs en las leguminosas. Por ejemplo, en *Medicago spp.* se han identificado dos sitios de unión de LCOs, NFBS1 y NFBS2, con diferentes afinidades y especificidad. También un grupo de lectinas con actividad apirasa, localizados en la membrana plasmática, parece tener capacidad de unión de LCOs (Cullimore *et al.* 2001).

## 6. OTROS COMPONENTES BACTERIANOS NECESARIOS PARA EL PROCESO DE NODULACIÓN E INFECCIÓN

Los LCOs ó factores Nod no son los únicos compuestos azucarados involucrados en el proceso de nodulación. Al igual que otras bacterias Gram-negativas, *Rhizobium* posee una estructura superficial formada por 2 membranas: la membrana citoplasmática, compuesta de fosfolípidos y proteínas de membrana, y la membrana externa, constituida por lipoproteínas y fosfolípidos en su zona interior, y por porinas y lipopolisacáridos (LPS) en su parte exterior. Entre ambas se localiza el espacio periplásmico, en el que aparecen proteínas con funciones estructurales y enzimáticas diversas, junto a unos oligosacáridos característicos, los  $\beta$ -glucanos cíclicos. A continuación, en la zona externa del espacio periplásmico, se localiza una capa de peptidoglucano (PG), a la que se unen lipoproteínas de la membrana externa. Sobre la membrana externa se encuentra la cápsula, formada por adhesinas, lectinas, exopolisacáridos ácidos (EPS), y en el caso de *R. leguminosarum*, un polisacárido neutro capsular (CPS). En *S. meliloti*, se ha aislado una superficie

polisacáridica adicional, denominada KPS, similar al antígeno K de *E. coli* (Coronado *et al.*, 1996). El estudio de mutantes defectivos en la producción de polisacáridos superficiales, que además presentan alterada su capacidad simbiótica, evidencia que estos componentes superficiales son especialmente importantes en el proceso de infección, donde una vez reconocidos por la planta, podrían actuar conjuntamente suprimiendo las respuestas de defensa de la planta (Reuhs *et al.*, 1995; Niehaus *et al.*, 1998).

### 6.1. Exopolisacáridos (EPS)

La síntesis de EPS bacterianos está codificada por numerosos genes, los genes *exo* y *exp*. En *S. meliloti*, la principal forma de EPS es un succinoglucano de carácter ácido, denominado EPS-I. La falta de EPS-I se traduce en la formación de nódulos no fijadores, carentes de bacterias en su interior (pseudonódulos). Yang *et al.*, (1992) han visto que la inoculación de *Medicago sativa* con mutantes EPS resulta en un retraso de la curvatura del pelo radical, y que los cordones de infección abortan en las células periféricas del nódulo en desarrollo. La formación de estos pseudonódulos va acompañada de la inducción en la planta de una respuesta defensiva (Niehaus *et al.*, 1993). Bajo determinadas circunstancias, algunas cepas pueden producir un EPS alternativo, un galactoglucano denominado EPS-II, el cual puede compensar la ausencia de EPS-I (Glazebrook y Walker, 1989).

Dependiendo de las condiciones de crecimiento, la bacteria puede sintetizar y excretar EPS de bajo o de alto peso molecular (LMW o HMW, del inglés “High” o “Low Molecular Weight”). La adición exógena de fragmentos purificados de EPS permite la correcta infección del nódulo por mutantes *exo* de *S. meliloti*. Así, algunos mutantes defectuosos en la producción de EPS-I pueden ser complementados mediante la aplicación exógena de LMW EPS-I. En el caso de EPS-II, sólo se observa una recuperación cuando se añade LMW EPS-II, pero no con HMW EPS-II, lo que significa que la forma simbióticamente activa de los polisacáridos EPS-I y EPS-II es la forma LMW (Battisti *et al.*, 1992).

Las deficiencias de los mutantes EPS<sup>-</sup> para establecer simbiosis con plantas que forman nódulos indeterminados parecen más severas que con hospedadores que forman nódulos de tipo determinado, por lo que se ha propuesto que los EPS podrían no ser esenciales para la nodulación en este último caso. Se ha sugerido también una posible

correlación entre los distintos fenotipos simbióticos y las diferencias en la formación de cordones de infección en ambos tipos de nódulos (Kijne *et al.*, 1992)

### 6.2. Glucanos cíclicos

En *Rhizobium*, las proteínas necesarias para la síntesis de  $\beta$ -glucanos están codificadas por los genes *ndv*. La caracterización de los loci *ndvA* y *ndvB*, requeridos para la nodulación, demostró que eran estructural y funcionalmente homólogos a los genes *chvA* y *chvB* de *Agrobacterium tumefaciens*, necesarios para la virulencia y el anclaje de la bacteria a las células de la planta hospedadora (Dylan *et al.*, 1986). Mutantes *ndv* forman pseudonódulos que carecen de bacteroides, no tienen cordón de infección y no fijan nitrógeno (Geremia *et al.*, 1987). Aunque está claro que mutaciones que suprimen la producción de  $\beta$ -(1,2)-glucanos afectan a la nodulación, no se puede asegurar que la pérdida de este polisacárido sea la causa directa del defecto simbiótico. De hecho se han aislado pseudorrevertientes, capaces de formar nódulos  $\text{Fix}^+$ , que mantenían la incapacidad para producir  $\beta$ -glucanos (Dylan *et al.*, 1990b). Los mutantes *ndv* y *chv* están afectados en el crecimiento en medios hipoosmóticos, mostrando una reducción significativa del número de flagelos y baja movilidad, así como una mayor producción de polisacáridos extracelulares (Dylan *et al.*, 1990b; Soto *et al.*, 1992). Así, la posible función de los  $\beta$ -glucanos cíclicos durante la nodulación está estrechamente asociada con la capacidad de osmoadaptación de la bacteria, ya que revertientes que recuperan la capacidad osmorreguladora son infectivos, lo que significa que podrían jugar un papel importante en el mantenimiento de la integridad celular de la bacteria (Dylan *et al.*, 1990a).

### 6.3. Lipopolisacáridos (LPS)

Los LPS, que constituyen el principal componente estructural de la membrana externa de bacterias Gram-negativas, tienen también un papel muy importante en la interacción *Rhizobium*-leguminosa. Los LPS están formados por una porción polisacáridica y una porción lipídica (lípidos A). La fracción polisacáridica comprende un núcleo oligosacárido y una molécula de alto peso molecular y estructura variable, llamada antígeno O, que confiere propiedades antigénicas específicas. El lípido A consiste de un

oligosacárido al que se unen ácidos grasos, y se localiza en la bicapa de la membrana externa (Carlson *et al.*, 1993).

La caracterización de mutantes afectados en genes *lps* (García de los Santos *et al.*, 1997; Stacey *et al.*, 1991; Noel *et al.*, 1986) ha permitido relacionar la síntesis de LPS con mecanismos de desarrollo del nódulo. Así, mutantes en LPS presentan deficiencias en la iniciación de la infección, la invasión de los tejidos de la raíz, la liberación de las bacterias, y en el desarrollo y diferenciación de los bacteroides. En guisante, se ha descrito que durante el proceso de infección por un mutante *lps*, estas deficiencias se acompañan de una respuesta local de defensa de la planta (Perotto *et al.*, 1994). Por otra parte, la alteración en la distribución de epitopos del antígeno O durante el desarrollo del nódulo, indica la existencia de cambios en la estructura del LPS asociados a la diferenciación del bacteroide. Las diferencias encontradas en los LPS durante el desarrollo del bacteroide y la falta de sincronía entre la división de la bacteria y de la membrana peribacteroidal de los mutantes *lps* (Perotto *et al.*, 1994), sugieren un papel determinante de los LPS en la interacción de la bacteria con la membrana peribacteroidal. Aunque la función exacta de los LPS en la simbiosis no se conoce, se ha propuesto que estos compuestos pueden jugar un papel fundamental en las interacciones específicas entre las superficies celulares bacteriana y vegetal. En plantas con nódulos determinados, esta interacción ocurriría durante la formación y el desarrollo del cordón de infección, mientras que en nódulos indeterminados esta interacción sucedería primero durante la liberación de las bacterias en las células corticales del hospedador y posteriormente durante la división sincrónica del bacteroide y de la membrana peribacteroidal. Esto explicaría por qué los mutantes *lps* de cepas que interaccionan con leguminosas que forman nódulos determinados, están más afectados en el proceso de invasión que aquéllas que forman nódulos indeterminados. Otra posible función podría ser el enmascaramiento de los inductores de las respuestas de defensa del hospedador (Perotto *et al.*, 1994).

### 6.4. Polisacárido capsular de tipo K ( KPS)

Los KPS son oligosacáridos capsulares análogos al antígeno K de *E. coli*, compuestos por un disacárido de ácido aminohexulósico y de una variante de Kdo.

En la estirpe Rm41 de *S. meliloti*, la presencia de KPS puede sustituir funcionalmente la deficiencia de esta cepa para producir EPS-I y EPS-II, lo que le permite formar nódulos fijadores en alfalfa. La mutación en los genes *rpk*, determinantes de la producción de KPS, provoca el fenotipo Fix<sup>-</sup> en el fondo genético *exoB* de la estirpe AK631 (derivada de Rm41) (Reuhs *et al.*, 1995; Willians *et al.*, 1990).

## 7. OTROS GENES BACTERIANOS NECESARIOS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS

Durante la interacción con la planta, *Rhizobium* está expuesto a tres ambientes diferentes: primero la rizosfera, después el cordón de infección, y por último el compartimento peribacteroidal. Se han identificado y caracterizado diversos regulones de genes que se expresan específicamente en cada uno de estos ambientes (Long, 1989; Denarié *et al.*, 1992). Como se ha expuesto en apartados anteriores, los genes de nodulación (*nod*, *nol*, *noe*) están involucrados en las etapas tempranas de la interacción bacteria-planta, incluyendo la producción de factores Nod. Mutaciones en estos genes impiden ó retrasan la infección de la planta por parte de la bacteria (van Rhijn y Vanderleyden, 1995; Long, 1996). También hay genes encargados de la producción de EPS, LPS, y polisacáridos capsulares (*exo/ exp*, *lps*, *rpk*) que son necesarios para la invasión bacteriana. Mutaciones en estos genes provocan generalmente el aborto de los cordones de infección, provocando la formación de pequeños nódulos que no contienen bacterias y que son Fix<sup>-</sup>. Otros genes (*nif* y *fix*) se expresan en bacteroides de nódulos maduros y codifican para la nitrogenasa y otras proteínas importantes para la fijación de nitrógeno.

En este apartado se hará una pequeña revisión de “otros genes” que son necesarios tanto en condiciones de vida libre como en el proceso de infección de la planta hospedadora (Niner y Hirsch, 1998). De especial interés son las rutas de biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos, cuya alteración tiene con frecuencia una influencia negativa

sobre el proceso simbiótico. En muchos casos de auxotrofías, los genes correspondientes no han sido caracterizados, mientras que en otros, diferentes auxotrofos para un mismo compuesto muestran distinto fenotipo simbiótico, lo que sugiere un papel de actividades enzimáticas particulares durante el establecimiento de la simbiosis.

### 7.1. Genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos

La alteración en distintas rutas metabólicas de biosíntesis de aminoácidos suele tener un efecto negativo sobre la capacidad de *Rhizobium* para nodular su leguminosa hospedadora. De esta forma se han descrito cepas de *Rhizobium* auxotrofas para diferentes aminoácidos, que inducen la formación de nódulos inefectivos o son incapaces de nodular. En muchos casos, la adición exógena del aminoácido correspondiente permite la recuperación del fenotipo simbiótico silvestre (Beringer *et al.*, 1980; Kerppola y Kahn, 1988), lo que sugiere que los defectos simbióticos observados son una consecuencia directa del déficit nutritivo provocado por la auxotrofia. Los nódulos que forman en alfalfa mutantes de *S. meliloti* auxotrofos para la leucina están completamente vacíos de bacterias y por tanto son Fix<sup>-</sup>. En estos nódulos la formación de cordones de infección está limitada y no ocurre la liberación de las bacteria desde el cordón de infección y su endocitosis por las células vegetales (Truchet *et al.*, 1980). La adición de leucina ó alguno de sus precursores a la solución nutritiva de la planta provoca la recuperación de la formación de nódulos fijadores, con independencia de que dicho precursor pueda o no complementar la auxotrofia. Un fenotipo simbiótico similar se ha descrito para cepas Leu<sup>-</sup> y Phe<sup>-</sup> de *R. leguminosarum* bv. phaseoli (George y Robert, 1991).

Aguilar y Grasso (1991) han descrito que mutantes *ilvC* de *S. meliloti* muestran un fenotipo Nod<sup>-</sup> en alfalfa. El gen *ilvC* codifica para una acetohidroxiácido isomeroreductasa, enzima que participa en la ruta biosintética de la isoleucina y la valina. Las cepas *ilvC* inducen la deformación del pelo radical y la formación de meristemos, pero no inducen la formación de cordones de infección, lo que se traduce en el desarrollo de nódulos (pseudonódulos) muy pequeños y no infectados, en los que no se expresan diversas nodulinas tempranas (López *et al.*, 2000). Ni la isoleucina ni compuestos intermediarios en su ruta biosintética pueden restaurar la nodulación. Sin embargo, la complementación con el gen *ilvC* de *E. coli* permite tanto la recuperación de la prototrofia

como la nodulación efectiva. Los autores sugieren que los auxotrofos *IlvC<sup>-</sup>* mantienen un intercambio anómalo de señales con la planta, debido a la acumulación o ausencia de algún compuesto en cuya metabolismo interviene la proteína *IlvC* (López *et al.*, 2000).

En el caso de mutantes en el metabolismo de la prolina, existen datos contradictorios. Las cepas *putA* de *S. meliloti*, que carecen de prolina deshidrogenasa, están afectados en la colonización de las raíces de alfalfa, lo que sugiere un posible papel de la prolina excretada por las raíces como nutriente clave en la rizosfera durante la nodulación. Este defecto en la colonización se refleja en una pérdida de competitividad y una nodulación retrasada (Jimenez-Zurdo *et al.*, 1995). En cambio, cepas *proC* de *B. japonicum*, que son auxotrofas para prolina, forman nódulos pequeños que contienen pocas bacterias y no muestran actividad nitrogenasa (King *et al.*, 2000). Estos datos sugieren que las raíces de soja no excretan suficiente prolina para compensar los requerimientos de estos mutantes, y ponen en entredicho el papel de la prolina como un importante nutriente en la rizosfera de plantas leguminosas.

Otras auxotrofias para aminoácidos pueden causar también graves efectos sobre el desarrollo del bacteroide. Así, mutantes *glyA* de *B. japonicum*, forman numerosos y minúsculos nódulos *Fix<sup>-</sup>* a lo largo de toda la raíz de plantas de soja (Rossbach y Hennecke, 1991). *glyA* codifica para una serina hidroximetiltransferasa, la cual es la responsable de la biosíntesis de glicina a partir de serina. Sin embargo es posible que la bacteria tenga una ruta biosintética para glicina adicional, ya que el fenotipo observado no es muy estable.

En *S. meliloti*, la pérdida del gen *trpE(G)* provoca también defectos en el establecimiento de la simbiosis. Este gen *trpE(G)* codifica para una antranilato sintasa, enzima que cataliza el primer paso en la ruta biosintética del triptófano. Mutantes *trpE(G)* forma nódulos de 2 tipos: nódulos de tipo A, que son *Fix<sup>+</sup>*, y nódulos de tipo B, que son *Fix<sup>-</sup>*. Ambos tipos de nódulos muestran una zona II de gran tamaño, cordones de infección normales, y numerosas células que contienen almidón en la zona II-III. Los nódulos de tipo A tienen una zona III normal, llena de bacteroides. En cambio, mutaciones que afectan a enzimas posteriores en esta ruta biosintética no impiden la formación de nódulos *Fix<sup>+</sup>* en alfalfa (Barsomian *et al.*, 1992). Mutaciones en genes de biosíntesis de aminoácidos aromáticos, genes *aro*, inducen la formación de nódulos *Fix<sup>-</sup>* en alfalfa (Barsomian *et al.*,

1992), lo que sugiere que el antranilato, y no el triptofano, es necesario para la fijación de nitrógeno.

Cepas *metZ* de *R. etli*, carentes de la enzima succinil-homoserina sulfidrilasa, son auxotrofos para metionina e incapaces de inducir la formación de nódulos en raíces de *P. vulgaris*, a menos que se adicione metionina a la solución nutritiva vegetal (Taté *et al.*, 1999). En presencia de metionina exógena, las cepas *metZ* son capaces de formar nódulos, si bien éstos son pobres fijadores de nitrógeno, lo que indica que la biosíntesis de metionina es importante también durante las etapas tardías de la simbiosis y que las raíces de *P. vulgaris* no proporcionan a la bacteria una cantidad suficiente de este aminoácido.

En el caso de auxotrofos para histidina, los defectos en la simbiosis dependen de la actividad enzimática afectada. Por ejemplo, cepas de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* auxotrofos para histidina alterados en las primeras etapas de la ruta biosintética tienen graves problemas para nodular, mientras que aquéllos afectados en el último paso de la ruta (histidinol deshidrogenasa) forman nódulos no fijadores (Yadav *et al.*, 1998). El hecho de que estos últimos sean capaces de nodular sugiere que en la rizosfera de la planta (trébol en este caso) existe suficiente histidina para que éstos nodulen, pero no así en el interior del nódulo. La adición de histidina al medio nutritivo de la planta no restaura el defecto simbiótico de ninguno de estos mutantes, lo que implica que ciertas actividades enzimáticas como la histidinol-fosfato fosfatasa son necesarias durante el proceso de nodulación, mientras que otras como la histidinol deshidrogenasa son importantes para la fijación de nitrógeno por los bacteroides (Yadav *et al.*, 1998). Por el contrario, aunque ciertos auxotrofos His<sup>-</sup> de *B. japonicum* son también Nod<sup>-</sup>, este fenotipo es revertido tras la adición de histidina a la solución nutritiva de la planta (Sadowsky *et al.*, 1986).

### 7.2. Genes implicados en la biosíntesis de bases nitrogenadas

Los mutantes de diversas especies de *Rhizobium* alterados en la biosíntesis de bases nitrogenadas inducen la formación de nódulos pequeños e irregulares en sus respectivas plantas hospedadoras (Beringer *et al.*, 1980; VandenBosch *et al.*, 1985; Swamynathan y Singh., 1992; Kerppola y Kahn, 1988; Noel *et al.*, 1988; Newman *et al.*, 1994). Al igual que en el caso de algunos auxotrofos para aminoácidos, el fenotipo simbiótico de

auxotrofos para bases nitrogenadas no siempre es restaurado tras la adición exógena de la base nitrogenada o sus precursores.

Auxotrofos para purina de *S. meliloti* forman nódulos Fix<sup>-</sup>, en los cuales se puede ver curvatura del pelo radical y cordones de infección normales (Dickstein *et al.*, 1991; Swamynathan y Singh., 1992). Sin embargo, cepas Pur<sup>-</sup> de *R. etli* y de *Rhizobium* sp. NGR234, forman abultamientos en los que no se han formado cordones de infección (Vandesboch *et al.*, 1985; Djordjevic *et al.*, 1996). En el caso de *S. fredii*, cepas PurL<sup>-</sup> que son auxotrofos para adenina y tiamina, son Nod<sup>-</sup> o forman pseudonódulos dependiendo de la planta hospedadora. En cambio, estos mutantes forman nódulos fijadores en plantas con nódulos de tipo indeterminado, como *Glycyrrhiza uralensis* (Buendía *et al.*, 2000). En el caso de *R. leguminosarum* bv. phaseoli, las cepas Ade<sup>-</sup> muestran un fenotipo Nod<sup>-</sup> en *P. vulgaris* (George y Robert, 1991).

Por otra parte, mutantes PyrF<sup>-</sup> de *S. fredii*, deficientes en la biosíntesis de uracilo, forman pseudonódulos carentes de bacterias en su interior, en raíces de soja y alguna otras plantas hospedadoras (Ollero *et al.*, 2000), fenotipo similar al mostrado por cepas Ura<sup>-</sup> de *R. leguminosarum* bv. phaseoli (George y Robert, 1991). En el caso de las cepas *pyrF* de *S. fredii*, el uracilo exógeno no restaura la capacidad de formar nódulos fijadores en estos mutantes, aunque sí restablece el crecimiento en medio mínimo (Ollero *et al.*, 2000).

## 8. BIOSÍNTESIS DE LEUCINA EN BACTERIAS

En bacterias, la biosíntesis de leucina procede a través de una ruta metabólica específica a partir de  $\alpha$ -cetoisovalerato ( $\alpha$ -KIV). En enterobacterias, los genes implicados se organizan en un operón, *leuABCD*, cuya expresión esta sujeta a regulación por leucina mediante un mecanismo de atenuación de la transcripción (Umbarger, 1996).

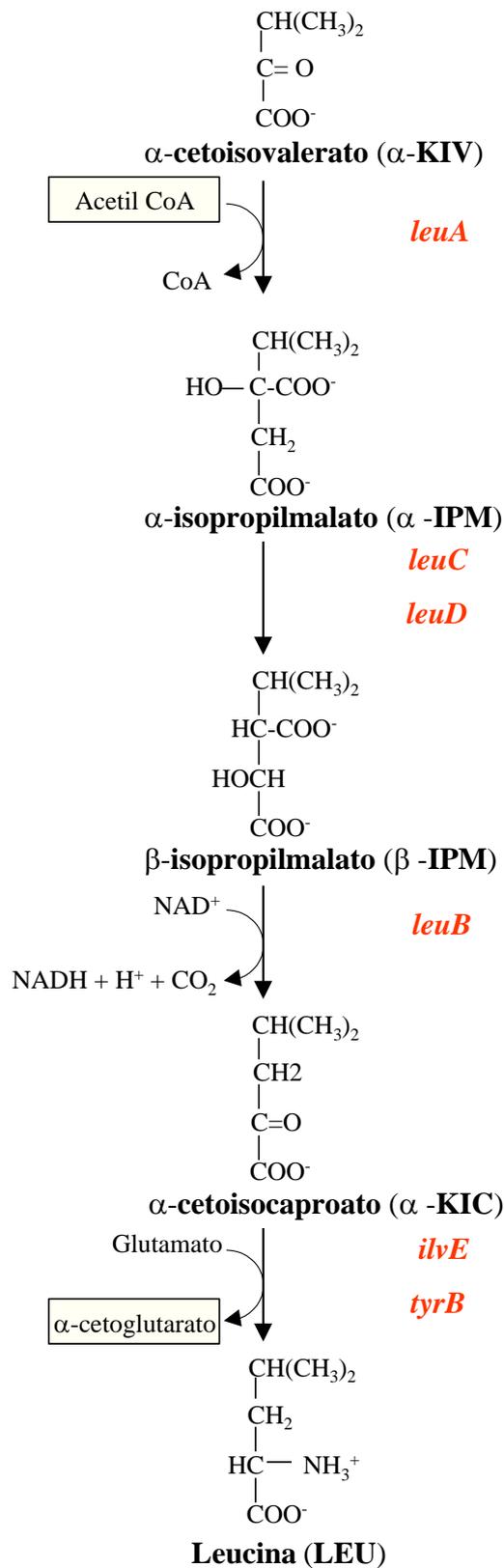
El primer paso de la ruta consiste en la condensación de un grupo acetilo y  $\alpha$ -KIV, para producir  $\alpha$ -isopropilmalato ( $\alpha$ -IPM) (Fig. I.5). Esta reacción es catalizada por la  $\alpha$ -IPM sintasa, codificada por el gen *leuA*, mediante un mecanismo enzimático análogo al de la formación de citrato a partir de oxalacetato. La  $\alpha$ -IPM sintasa es una enzima multimérica, y su actividad está sujeta a inhibición por el producto final de la ruta, leucina. El segundo paso enzimático consiste en la conversión del  $\alpha$ -IPM en su esteroisómero  $\beta$ -IPM, en una reacción catalizada por la  $\alpha$ -IPM isomerasa o IPM deshidratasa. Esta enzima

## Introducción

---

es un heterodímero de los productos de los genes *leuCD* y emplea un mecanismo enzimático muy similar al de la aconitasa. El  $\beta$ -IPM es convertido en  $\alpha$ -cetoisocaproato ( $\alpha$ -KIC) por la acción de la  $\beta$ -IPM deshidrogenasa, un homodímero del producto del gen *leuB* (Fig. I.5). Finalmente, el  $\alpha$ -KIC sufre una reacción de aminación para dar lugar a leucina. En *E.coli* esta reacción de transaminación puede ser llevada a cabo por dos enzimas diferentes, los productos de los genes *ilvE* y *tyrB*.

Aunque es previsible que en *Rhizobium* la ruta biosintética de la leucina sea similar a la de enterobacterias, nada se sabe sobre la organización de los genes implicados ni sobre su regulación



**FIGURA I.5. Biosíntesis de leucina en *E. coli*.**

## **OBJETIVOS**

---

Muchas de las especies y géneros bacterianos incluidos en la familia *Rhizobiaceae*, globalmente denominados *Rhizobium*, son capaces de establecer simbiosis fijadoras de nitrógeno con plantas leguminosas. La formación del nódulo de las leguminosas, que alberga a las bacterias, es el resultado del intercambio continuado de señales entre la planta y la bacteria que conduce a una diferenciación de ambos simbioses. Durante los últimos 20 años se han caracterizado algunas de las señales de comunicación entre los simbioses, así como ciertos mecanismos moleculares que permiten la interacción. Particularmente en la bacteria se han caracterizado multitud de genes necesarios para el establecimiento de la simbiosis, en especial aquéllos implicados en las etapas iniciales e intermedias de la simbiosis. También se sabe desde hace tiempo que muchos genes importantes durante la etapa saprofitica de las bacterias, lo son también, directa o indirectamente, para la formación de la simbiosis. En este grupo se encuentran genes necesarios para la biosíntesis de vitaminas o aminoácidos.

A finales de los años 70 se describió que los auxotrofos para la leucina formaban nódulos no fijadores de nitrógeno, nódulos que quedaban prácticamente vacíos pues no eran invadidos por las bacterias. Se pensaba entonces que los defectos a nivel simbiótico provocados por la auxotrofia eran debidos a la deficiencia metabólica de estos mutantes, puesto que la adición externa de leucina permitía a dichos auxotrofos recuperar la capacidad de formación de nódulos fijadores. En ningún caso se caracterizaron estos mutantes a nivel genético. Tampoco se contemplaron otras posibles explicaciones, como que el establecimiento de la simbiosis efectiva requiera, durante una o más de sus etapas, leucina o algún intermediario metabólico de la leucina, para el correcto intercambio de señales entre la planta y la bacteria.

La investigación realizada en esta tesis doctoral se ha centrado en el estudio de la relación entre la biosíntesis de leucina en *Rhizobium* y la formación de simbiosis efectivas con plantas leguminosas, con los siguientes objetivos concretos:

- 1) Caracterización molecular de genes que codifican para enzimas de la ruta biosintética de la leucina en *Rhizobium*.
- 2) Determinación del papel que la leucina o alguno de sus intermediarios metabólicos puedan jugar durante el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

# MATERIAL Y MÉTODOS

---

## 1. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS

Las diferentes cepas bacterianas así como los plásmidos utilizados en este trabajo se relacionan en la **Tabla 1**, junto con sus características más relevantes.

**Tabla 1.** Bacterias y plásmidos empleados en este trabajo.

Cepas y plásmidos	Características relevantes	Fuente o referencia
<b>Cepas bacterianas</b>		
<i>E.coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>recA</i> , <i>endA</i> , <i>lgyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , $\Delta$ lacU169, <i>deoR</i> , <i>F</i> $\lambda^-$	Bethesda Research Laboratory
S17.1	<i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>reca</i> , <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , Rp4-2-Tc::Mu-Km::Tn7, Tp <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup>	Simon <i>et al.</i> , 1983
HB101	<i>pro</i> , <i>leu</i> , <i>thi</i> , <i>lacY</i> , <i>endA</i> , <i>recA</i> , <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , Sm <sup>R</sup>	Boyer <i>et al.</i> , 1969.
CV512	Cepa <i>leuA</i>	Somers, J.M., 1973
<i>S. meliloti</i>		
GR4	Cepa silvestre; Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>-</sup>	Este laboratorio
GR401	Derivado de GR4 con inserción Tn5; Km <sup>R</sup> , Leu <sup>-</sup> Nod <sup>-</sup>	Este trabajo
GR402	Derivado de GR4 con inserción Tn5; Km <sup>R</sup> , Leu <sup>-</sup> Nod <sup>f</sup> , Fix <sup>-</sup>	Este trabajo
GR410	Derivado de GR4 con delección de <i>leuA</i> ; Km <sup>R</sup> , Leu <sup>-</sup> Nod <sup>-</sup>	Este trabajo
GR440	Derivado de GR4 con inserción de cassette de Sm/Spc en el gen <i>leuC</i> ; Km <sup>R</sup> , Leu <sup>+</sup> , Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>	Este trabajo
1021	Derivado de 2011, cepa silvestre; Sm <sup>R</sup> , Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>	Meade, H.M. <i>et al.</i> , 1982
1021-01	Derivado de 1021 con delección de <i>leuA</i> ; Sm <sup>R</sup> , Leu <sup>-</sup> , Nod <sup>-</sup>	Este trabajo
<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. viciae</i>		
UPM791	128C53; Sm <sup>R</sup> , Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup> , Hup <sup>+</sup>	Ruiz-Argüeso <i>et al.</i> , 1978
UPM791-01	Derivado de UPM791, <i>leu</i> ::Km; Sm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Leu <sup>-</sup> , Nod <sup>-</sup>	Este trabajo

## Material y Métodos

Cepas y Plásmidos	Características relevantes	Fuente o referencia
<b>Plásmidos</b>		
pCR 2.1-TOPO	Vector clonaje para productos PCR, Ap <sup>R</sup>	Invitrogen
pBluescript	Vector de clonaje y secuenciación, Ap <sup>R</sup>	Stratagene
pGMI149- <i>lacZV40</i>	<i>nodD3-lacZ</i> , Tc <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Maillet <i>et al.</i> ,1990
pGMI149- <i>lacZS4</i>	<i>nodH-lacZ</i> , Tc <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Maillet <i>et al.</i> ,1990
pJB3Tc19	Vector de clonaje derivado de RK2, Tra <sup>-</sup> , Mob <sup>+</sup> , Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup> .	Blantny <i>et al.</i> ,1997
pJB3Spc	Sm <sup>R</sup> ,Spc <sup>R</sup> derivado de pJB3Tc19	E.J. Bedmar, EEZ
pHP45Ω	cassette Sm/Spc, Sm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	Prentki y Krisch,1984
pHP45Ω-Km	cassette Km, Ap <sup>R</sup>	Prentki y Krisch,1984
pK18mobsac	pK18 derivado, cassette de sensibilidad a sacarosa ( <i>sacB</i> ), Km <sup>R</sup>	Schäfer <i>et al.</i> ,1994
pKw117	<i>gusA</i> en pTacter; Ap <sup>R</sup>	Wilson <i>et al.</i> ,1995
pSm <i>leuA</i>	<i>leuA</i> clonado en pJB3Spc; Ap <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , (Sm/Spc) <sup>R</sup>	Este trabajo
pMP220	Vector IncP para fusiones <i>lacZ</i> , Tc <sup>R</sup>	Spaink <i>et al.</i> , 1987
pMP154	IncQ, fusión <i>R.l.nodA-lacZ</i> ; Cm <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup>	Spaink <i>et al.</i> , 1987
pMP240	IncP, fusión <i>R.l.nodA-lacZ</i> , Sm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Spaink <i>et al.</i> , 1987
pMP224	IncQ, fusión <i>R.l.nodD-lacZ</i> , Sm <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Spaink <i>et al.</i> , 1987
pRmE43	<i>nodD1</i> expresado desde el promotor <i>trp</i> en pTE3, Tc <sup>R</sup>	Fisher <i>et al.</i> , 1988
pRmE65	<i>nodD3</i> expresado desde el promotor <i>trp</i> en pTE3, Tc <sup>R</sup>	Fisher <i>et al.</i> , 1988
pRmM57	IncP, fusion <i>R.m.nodC-lacZ</i> , Tc <sup>R</sup>	Mulligan y Long,1985
pRmM61	IncP fusion <i>R.m.nodD1-lacZ</i> , Tc <sup>R</sup>	Mulligan y Long,1985
pRm4013	Cósmido de la genoteca de GR4 que contiene <i>leuA</i> , Tc <sup>R</sup>	Este trabajo
pRm4023	Cósmido de la genoteca de GR4 que contiene <i>leuA</i> , Tc <sup>R</sup>	Este trabajo
pSP1	Fragmento <i>EcoRI</i> de 3,974 Kb que contiene <i>leuA</i> clonado en pUC18, Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
pSP1R	pSP1 con inserto en orientación inversa, Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
pSP13	Fragmento <i>HindIII-EcoRI</i> de pSP1 clonado en pUC18, Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
pSP11R	Fragmento <i>EcoRI-HindIII</i> de pSP1R clonado en pUC18, Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
pSP12R	Fragmento <i>HindIII</i> de pSP1R clonado en pUC18, Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
pSP3	Fragmento de 1,355 Kb que contiene el gen <i>leuC</i> clonado en PCR 2.1-TOPO, Ap <sup>R</sup>	Este trabajo

Cepas y plásmidos	Características relevantes	Fuente o referencia
<b>Plásmidos</b>		
pSP4	pSP3 con el gen de resistencia a Sm/Spc insertado en el sitio <i>AatII</i> , Ap <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> /Spc <sup>R</sup>	Este trabajo
pSP1ΔKm	Fragmento <i>Eco47III-PmlI</i> de pSP1 sustituido por gen de resistencia a Km, Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pSP1ΔKm202	pSP1ΔKm clonado en pSUP202, Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
pSPG18	Fragmento <i>SmaI-HindIII</i> de pKw117 en pSP1, Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
pSPG	Fragmento <i>EcoRI-HindIII</i> de pSG18 clonado en pJB3Tc19, Ap <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Este trabajo
pSPL1	Fragmento <i>EcoRI</i> de 3,686 Kb que contiene parte del gen <i>leuA</i> de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> UPM791 clonado en pUC18, Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
pSPL2	Fragmento <i>XhoI</i> de 4,2 Kb con <i>leuA</i> clonado en pBluescript, Ap <sup>R</sup>	Este trabajo
pSPL1Km	Gen de resistencia a Km en el sitio <i>BglIII</i> de pSPL1, Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Este trabajo
pSPL1Km202	Fragmento <i>EcoRI</i> de pSPL1Km clonado en pSUP202, Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Este trabajo
pSPLG	Fragmento <i>SmaI-HindIII</i> de pKw17 clonado en <i>SphII-HindIII</i> de pSPL2	Este trabajo
pSPZ	Fragmento <i>EcoRI-PstI</i> de pSP1 clonado en pMP220, Tc <sup>R</sup>	Este trabajo
pSUP202	Vector de clonación pBR325::mob, Tc <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	Simon <i>et al.</i> ,1983
pSUP2021	Vector derivado de pSUP202 que contiene Tn5, Km <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	Simon <i>et al.</i> ,1983
pUC18	Vector de clonación y secuenciación, Ap <sup>R</sup>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> ,1985

## 2. MEDIOS DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

### 2.1. Medios de cultivo para *E. coli*.

Para el cultivo rutinario de las cepas de *E. coli* se ha utilizado el medio de Luria-Bertani (LB, Miller, 1972):

## Material y Métodos

---

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

Como medio mínimo (MM) para *E. coli* se ha empleado el medio M9 (Miller, 1972):

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0'15 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	3 g
NaCl.....	0.5 g
CINH <sub>4</sub> .....	1 g
Biotina.....	0.0002 g
Pantotenato cálcico.....	0.0001 g
Agua desionizada.....	1000 ml

Se añaden 10 ml de una solución de CaCl<sub>2</sub> 0.01M, 10 ml de una solución al 20% de glucosa después de autoclavar. Ambos medios se prepararon ajustando el pH a 6'8-7'2, y se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

## 2.2. Medios de cultivo para *Rhizobium*.

### 2.2.1. *Sinorhizobium meliloti*.

Las cepas de *Rhizobium meliloti* fueron crecidas rutinariamente a 28 °C en medio TY (Beringer, 1974):

Triptona.....	5 g
Extracto de levadura.....	3 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0'9 g
Agar (medio sólido).....	15 g
Agua desionizada.....	1000 ml

Como medio mínimo (MM) para *Sinorhizobium meliloti* se ha empleado el medio de Robertsen *et al.*, (1981) modificado:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0'3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0'3 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0'15 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0'05 g
FeCl <sub>3</sub> .....	0'006 g
NaCl.....	0'05 g
Glutamato sódico.....	1'1 g
Manitol.....	10 g
Biotina.....	0'0002 g
Pantotenato cálcico.....	0'0001 g
Agar purificado (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 minutos.

#### 2.2.2. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

Las cepas de *Rhizobium leguminosarum* fueron crecidas rutinariamente a 28°C en medio YGT:

Triptona.....	5 g
Glucosa.....	15 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0'6 g
Extracto de levadura.....	2'5 g
Agar (medio sólido).....	15 g
Agua desionizada.....	1000 ml

Como medio mínimo (MM) de *Rhizobium leguminosarum* se ha utilizado el medio VF39:

## Material y Métodos

---

### Solución A:

Manitol.....	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1.0 g
NO <sub>3</sub> K .....	0.6 g
Agua desionizada.....	900ml
pH 7.2-7.4	

### Solución B:

FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O.....	0.1 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O.....	2.5 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O.....	1.0 g
Agua desionizada.....	1000 ml

### Solución C:

Biotina .....	1.0 g
Tiamina.....	1.0 g
Pantotenato.....	1.0 g
En 10 mL de agua desionizada y esterilizado por filtración.	

Se mezclan 900 ml de solución A, 100 ml de solución B y se autoclavó durante 20 min a 120 °C. Una vez estéril y frío se le añadió 1 ml de solución C. Para medio sólido se añadieron 13 g de agar purificado antes de la esterilización del mismo.

### **2.3. Antibióticos.**

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se hizo a partir de soluciones concentradas de los mismos en agua desionizada o, en caso de la tetraciclina y del cloranfenicol, en agua-etanol al 50%. La esterilización de los antibióticos se llevó a cabo mediante el empleo de unidades de filtración Minisart<sup>®</sup> NML (Sartorius), de 0'2 µm de tamaño de poro. La concentración final de los distintos antibióticos fue la siguiente:

Antibiótico	Concentración ( µg/ml)		
	<i>S. meliloti</i>	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. viciae</i>	<i>E. coli</i>
Espectinomicina (Spc)	200	200	50
Estreptomicina (Sm)	200	200	50
Tetraciclina (Tc)	10	5	10
Ampicilina (Ap)	-	-	200
Cloranfenicol (Cm)	-	5	50
Kanamicina (Km)	200	100	50

#### 2.4. Preparación de aminoácidos.

Todos los aminoácidos y precursores fueron añadidos al MM a partir de soluciones concentradas. Las soluciones se prepararon a una concentración de 100 mM en tampón fosfato sodico 0.1M pH 7.0, y se esterilizaron por filtración, conservándolas a 4°C.

#### 2.5. Conservación de cepas bacterianas.

Para la conservación prolongada de las distintas cepas se han utilizado criotubos que contenían alícuotas de cultivos bacterianos adicionados de glicerol estéril a una concentración final del 20%. Se mantuvieron almacenados a una temperatura de -80 °C.

### 3. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ADN

#### 3.1. Extracción de ADN plasmídico mediante lisis alcalina.

La obtención de ADN plasmídico se realizó siguiendo el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Para ello, las células de 1'5-3 ml de cultivo se recogieron por centrifugación (15.000 rpm, 2 min) en tubos de microfuga. Después de eliminar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 100 µl de solución I (glucosa 50 mM, EDTANa<sub>2</sub> 10 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 8) a la que se adicionó inmediatamente antes de usar 5 mg/ml de lisozima, y se incubaron las células durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 200 µl de solución II (NaOH 0'2M, SDS 1%) recién preparada, se mezclaron ambas soluciones mediante inversión, y se incubó en hielo durante 5 min. Pasado este tiempo, se adicionaron 150 µl de solución III (60 ml de acetato potásico

5M, 11'5 ml de ácido acético glacial y 28'5 ml de agua, pH 4'5), se agitó la mezcla por inversión del tubo y, después de incubar en hielo durante 5 min, se centrifugó (12.000 rpm, 2 min). El sobrenadante obtenido (aproximadamente 400 µl) se pasó a un nuevo microtubo, al que se adicionó un volumen igual de una mezcla de fenol-cloroformo (1:1), y tras mezclar bien por agitación en vórtex, se separaron las dos fases por centrifugación (12.000 rpm, 5 min). La fase superior acuosa, que contiene el ADN, se transfirió a un tubo nuevo, se mezcló con 2'5 volúmenes de etanol absoluto preenfriado a -20 °C, se incubó a -80 °C durante 30 min y a continuación se centrifugó (12.000 rpm, 15 min). El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70% preenfriado a -20 °C y se centrifugó de nuevo (15.000 rpm, 3 min). Por último, después de eliminar el sobrenadante, el precipitado se secó al vacío y se resuspendió en 25 µl de tampón TE8 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) .

Para eliminar el ARN, al volumen anterior se puede adicionar 1 µl de ribonucleasa A preparada de forma concentrada (10 µg/ml en NaCl 15 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 7'5). De forma previa a su utilización, la solución concentrada de RNasa se calentó a 100 °C durante 15 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se prepararon alícuotas y se almacenaron a -20 °C.

La mezcla fenol-cloroformo (proporción 1:1) se preparó a partir de fenol al 100% que contenía 8-hidroxiquinoleína al 0'1% en Tris-HCl 0'5 M (pH 8), y de una mezcla de alcohol isoamílico y cloroformo en proporción 1:24.

### **3.2. Extracción mediante QIAprep<sup>R</sup> Spin Miniprep Kit.**

A partir de un cultivo líquido de 1-5 ml de *E. coli*, las células se precipitaron, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 250 µl del denominado tampón P1 previamente adicionado de RNasa A. Posteriormente, se adicionaron 250 µl del tampón P2, mezclando suavemente mediante inversión del tubo. P2 es un tampón de lisis, y se recomienda mantener la reacción 5 min como máximo. A la mezcla anterior se adicionaron 350 µl de tampón N3, se mezcló por inversión y se centrifugó (12.000 rpm) hasta la formación de un precipitado compacto (aprox. 10 min). Se recogió el sobrenadante y se aplicó a una columna Qiaprep que se centrifugó durante 1 min para retener el ADN plasmídico. A la columna se adicionaron 750 µl de tampón PE y se centrifugó 1 min a 12.000 rpm, repitiéndose de nuevo esta operación para eliminar el exceso de tampón. Finalmente, la

columna se colocó en un tubo de 1'5 ml, se le adicionaron 50 µl de agua bidestilada estéril, y pasado 1 min se centrifugó (12.000 rpm, 1 min) para recuperar el ADN.

### 3.3. Extracción de ADN genómico.

El aislamiento de ADN total se llevó a cabo a partir de 5 ml de cultivo en fase logarítmica de la cepa bacteriana elegida. Las células se centrifugaron a 12.000 rpm durante 3 min y se lavaron con 200 µl de sarcosil (N-lauril sarcosina) al 0'1% en TE8 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) y se resuspendieron en 300 µl de TE8. A la suspensión resultante se adicionaron 100 µl de una solución de SDS al 5% y 100 µl de una solución (2'5 µg/ml) de proteinasa K o pronasa predigerida en TE8. La mezcla se incubó durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente se adicionaron 125 µl de ClNa 5M preparado en TE8 y se incubó en hielo durante 30 min. A la mezcla se le adicionó un volumen igual de fenol y se mezcló por vortex intenso durante 1 min, dejándola reposar y mezclando de nuevo por vortex durante 1 min. Seguidamente se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se pasó a un nuevo tubo de microfuga. A continuación se extrajo nuevamente con un volumen de fenol, posteriormente con un volumen de fenol:cloroformo y finalmente con un volumen de cloroformo para eliminar los posibles restos de fenol. La fase acuosa se transfiere a un tubo nuevo y se precipita con 2'5 volúmenes de etanol al 100% preenfriado a -20 °C, mezclando por inversión e incubando durante 30 min a -80 °C. Transcurrido ese tiempo se centrifuga a 12.000 rpm durante 12 min y se retira el sobrenadante. Se lava con etanol al 70% preenfriado sin agitar ni mezclar y de nuevo se centrifuga durante 3 min. Se retira el sobrenadante y se seca el ADN al vacío durante 20-30 min. Finalmente se resuspende el ADN seco en 25-50 µl de TE8 y se añade 1 µl de RNAsa (1mg/ml). El ADN se conserva a -20 °C hasta su uso.

### 3.4. Determinación de la concentración de ADN.

Se ha seguido el método espectrofotométrico descrito en Sambrook *et al.*, (1989). La absorbancia ( $A_{260}$  nm y  $A_{280}$  nm) de las soluciones de ADN en agua o en TE8 se determinaron utilizando como blanco agua o TE8, respectivamente. La concentración se calcula respecto a los valores estándar de  $DO_{260} = 1$  para soluciones con 50 µg/ml de ADN de cadena doble. La relación  $DO_{260}/DO_{280}$  se usa para estimar la pureza de la preparación,

considerándose valores inferiores a  $10^8$  como indicadores de contaminación por proteínas o fenol.

## 4. MANIPULACIÓN DEL ADN

### 4.1. Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción.

La digestión total de ADN con enzimas de restricción se llevó a cabo en las condiciones óptimas para cada enzima, siguiendo las indicaciones, en cuanto a temperatura y tampón, recomendadas por los proveedores. (Boehringer, Mannheim, Alemania).

Las digestiones con más de una enzima de restricción se realizaron simultáneamente cuando las enzimas requerían el mismo tampón y temperatura. En caso contrario, y siempre que fuera factible, se digirió primero con la enzima que requería el tampón de menor fuerza iónica, adicionando posteriormente el tampón y enzima para la segunda digestión. Cuando esto no fue posible, se llevó a cabo primero la digestión con una enzima, se limpió luego el ADN mediante tratamiento con fenol-cloroformo, se precipitó con etanol y, posteriormente, se resuspendió en agua, llevándose a cabo entonces la digestión con la segunda enzima.

### 4.2. Separación e identificación de fragmentos de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa.

#### 4.2.1. Electroforesis de ADN.

La separación de fragmentos de restricción se ha llevado a cabo mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa sumergidos en TBE (Tris 89 mM, EDTA- $\text{Na}_2$  2'5 mM,  $\text{BO}_3\text{H}_2$  89 mM, pH 8'2). La concentración de agarosa ha sido del 0'7% o del 1%, según el tamaño de los fragmentos a resolver. El voltaje usual de trabajo ha sido de 120 V en cubetas de electroforesis GNA 200 (Pharmacia) y de 80 V en cubetas de electroforesis GNA 100 (Pharmacia). Como tampón de carga se ha utilizado una mezcla de sacarosa al 40% y azul de bromofenol al 0'25%, ambos preparados en agua. Se ha empleado 1  $\mu\text{l}$  de tampón de carga por cada 5  $\mu\text{l}$  de solución de ADN.

### 4.2.2. Revelado de geles y fotografía.

Las muestras de ADN presentes en los geles de agarosa se revelaron sumergiéndolos en agua a la que previamente se adicionan unas gotas de una solución de bromuro de etidio (1 mg/ml), durante 15-20 min. Posteriormente se observaron bajo luz UV (260 nm) en un transiluminador.

Las fotografías de los geles se han realizado con una cámara Polaroid MP-4 provista de filtro rojo y película Polaroid 667 o 665. Alternativamente, se ha utilizado una videocámara acoplada a un sistema de impresión de imágenes (Gelprinter vm509) y el analizador de imágenes Quantity One de BioRad<sup>R</sup>.

### 4.2.3. Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción.

La determinación del tamaño molecular de fragmentos de restricción se ha efectuado a partir de la construcción de gráficas en las que se representa el logaritmo del tamaño molecular relativo ( $M_r$ ) de moléculas patrón de ADN, frente a la movilidad relativa ( $R_f$ ) de dichas moléculas en gel de agarosa, esto es, la distancia de migración de cada una dividida por la longitud del gel. Como marcadores de tamaño molecular se han utilizado los fragmentos de restricción del ADN del fago lambda resultantes de la digestión con endonucleasa *HindIII* o *EcoRI/HindIII*.

## **4.3. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.**

Para la purificación de fragmentos de ADN de los geles de agarosa se ha utilizado el sistema GeneClean II<sup>®</sup> (Bio 101 Inc., La Jolla, California, USA). Una vez identificado el fragmento de restricción que se desea purificar, se corta el gel de agarosa alrededor del mismo con un bisturí, se coloca en un microtubo y se trocea lo más homogéneamente posible. Al tubo se adicionan 4.5 volúmenes de NaI y 1/2 volumen de modificador-TBE<sup>®</sup> (mezcla concentrada de sales que neutraliza el efecto inhibitor del tampón TBE sobre la adhesión del ADN al glassmilk<sup>®</sup>; su uso es necesario, por tanto, sólo cuando la electroforesis se haya realizado en tampón TBE) y tras agitar en vórtex se incubó a 50 °C durante el tiempo necesario (aprox. 5 min) para que la agarosa se disuelva. Posteriormente, se adicionó

glassmilk<sup>®</sup> (5 µl/5µg ADN; esta concentración debe aumentarse en 1 µl adicional por cada 0'5 µg en exceso de ADN). El glassmilk<sup>®</sup> consiste en una suspensión de una matriz de sílice en agua y es marca registrada de Bio 101 Inc., La Jolla, California. Después de mezclar, la suspensión se incubó en hielo, al menos 5 min, para permitir la adhesión del ADN a la sílice, agitando cada 1-2 min para prevenir la precipitación de la misma. A continuación, se centrifugó (15.000 rpm, 5 segundos) para precipitar el ADN que permanece unido a la matriz, y se lavó 3 veces con solución New Wash<sup>®</sup> (mezcla específica de NaCl, Tris, EDTA, etanol y agua) preenfriada a -20 °C. Tras eliminar el último sobrenadante, el ADN se separó de la matriz de sílice eluyendo con 10 µl de agua bidestilada o tampón TE y calentando a 50 °C durante 2 min. Después de centrifugar (15.000 rpm, 30 s), el sobrenadante se recogió cuidadosamente y se colocó en un nuevo tubo. El último paso se puede repetir para eluir el ADN que pueda permanecer unido a la matriz de sílice.

Alternativamente también se ha usado el kit de extracción de QUIAGEN<sup>®</sup>, QIAEX II, siguiendo el protocolo de la casa comercial.

#### **4.4. Manipulación de los fragmentos de restricción.**

Los fragmentos de restricción, una vez aislados de los geles de agarosa y purificados pueden manipularse de distinta manera, de acuerdo con su utilización posterior.

##### 4.4.1. Ligación de fragmentos de restricción con vectores de clonación.

La ligación entre un fragmento de ADN y el vector de clonación adecuado, se efectuó usando relaciones molares vector:inserto variables, dependiendo, por una parte, del tamaño de los fragmentos y, por otra, del tipo de extremos, romos o cohesivos, del fragmento en cuestión. En todos los casos, el volumen final de mezcla de reacción fue de 10-20 µl. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de la enzima DNA ligasa del fago T4 y en el tampón indicado por los proveedores, incubando 3-4 h a temperatura ambiente o, alternativamente, durante una noche a 15 °C. Cuando se trataba de una ligación de extremos romos, se adicionó polietilenglicol (PEG 8.000) a una concentración final del 20%. En este último caso la temperatura de incubación fue de 20 °C.

### 4.4.2. Relleno de extremos 5' protuberantes de fragmentos de restricción.

Para la creación de extremos romos en fragmentos de restricción con extremos 5' protuberantes, se procedió al relleno del extremo 3' de la cadena complementaria. Para ello, a 20 µl de solución de ADN se adicionó 1 µl de una solución 1 mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y 1 unidad de ADN polimerasa Klenow por µg de ADN. La mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y se detuvo por adición de 200 µl de tampón TE y extracción con 200 µl de fenol-cloroformo. Se recogió el sobrenadante y el ADN se precipitó con 0'1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5'2) y 2 volúmenes de etanol absoluto. Finalmente, el ADN se resuspendió en agua bidestilada estéril.

### 4.4.3. Eliminación de extremos 3' protuberantes de fragmentos de restricción.

En el caso de que la digestión de ADN produjese fragmentos con extremos 3' protuberantes, la eliminación de los mismos se efectuó adicionando a la solución de ADN (20 µl) 1 µl de una solución 2 mM de dNTPs y 1 unidad de ADN polimerasa del bacteriófago T4 por µg de ADN. La mezcla se incubó durante 15 min a 12 °C. La inactivación de la polimerasa se realizó mediante calentamiento a 70 °C durante 10 min y posterior adición de 200µl de tampón TE y extracción con 200µl de fenol-cloroformo. Se recogió el sobrenadante y la recuperación de ADN se llevó a cabo como se ha descrito en el apartado anterior.

## **4.5. Preparación y transformación de células competentes de *E. coli*.**

La preparación de células competentes de *E. coli* se ha realizado esencialmente según la técnica descrita por Lederberg y Cohen (1974). A partir de un cultivo de la cepa de *E. coli* a transformar, se inoculó medio LB (1 ml cultivo/100 de medio) y se incubó en agitación a 37 °C hasta que el cultivo alcanzó una  $DO_{600}$  de 0'6. Tras dejar enfriar en hielo, las células se centrifugaron (10.000 rpm, 5 min, 4 °C), se resuspendieron en 1 volumen de una solución de  $MgCl_2$  0'1 M preenfriada a 4 °C, y se centrifugó de nuevo (5.000 rpm, 5 min, 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 y, tras dejarlas en hielo un mínimo de 30 min, se centrifugaron (5.000 rpm, 5 min, 4 °C) y se resuspendieron suavemente en 1/10 volumen de una solución de

CaCl<sub>2</sub> 0'1 M y glicerol al 20% preenfriada a 4 °C. Las células así preparadas se repartieron en alícuotas de 100 µl en tubos eppendorf preenfriados a 4 °C, que se conservaron a -80 °C hasta su uso. 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. A alícuotas de 100 µl de células competentes se adicionó ADN (0'05-0'5 µg) y la mezcla, después de su incubación en hielo un mínimo de 30 min, se sometió a un choque de calor de 42 °C durante 2 min. Posteriormente, la mezcla se incubó 5 min en hielo, se le adicionó 1 ml de medio LB y se incubó a 37 °C durante 60-90 min. Transcurrido este tiempo se sembraron alícuotas de 0'1 ml en placas de medio LB adicionado de los correspondientes antibióticos.

### **4.6. Experimentos de hibridación ADN-ADN.**

#### 4.6.1. Transferencia de ADN a filtros de nylon.

La transferencia de fragmentos de restricción de ADN a filtros de nylon se realizó según la técnica de Southern (1975). Para ello, después de la correspondiente electroforesis, el gel de agarosa se sumergió en una solución de HCl 0'25 M durante 20 min para someter el ADN a depurinación ácida. Tras lavar varias veces con agua destilada, se procedió a desnaturalizar el ADN mediante inmersión repetida (dos veces) en una solución de NaOH 0'5 M, NaCl 1'5 M, durante 15 min. Por último, el gel se incubó en una solución de Tris-HCl 0'5 M, NaCl 3 M, pH 7, (2 x 15 min). Después de lavar el gel con agua destilada, se colocó sobre una superficie plana y regular, habitualmente un cristal, cubierta con papel Whatman 3MM cuyos extremos, a modo de mecha, se sumergen en un reservorio de tampón de transferencia 10xSSC (1xSSC: NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM, pH 7). Sobre el gel se colocaron, en este orden, un filtro de nylon y tres piezas de Whatman 3MM de tamaño similar al gel (el filtro y las piezas de papel Whatman se lavaron primero con agua destilada y se saturaron después en tampón 20xSSC durante 30 min). Sobre este dispositivo se colocaron varias piezas de papel de celulosa y, sobre éstas, a su vez, un peso de aproximadamente 1 Kg para mantener el sistema ligeramente comprimido. El proceso de transferencia de ADN del gel a la membrana de nylon se realizó, normalmente, durante una noche.

Una vez finalizada la transferencia, el filtro de nylon se lavó con una solución de 2xSSC para eliminar restos de agarosa, se secó a temperatura ambiente y se expuso durante 5

min a luz ultravioleta, o alternativamente durante 20 min. a 120 °C en vacío, para fijar el ADN a la membrana.

### 4.6.2. Marcaje de sondas de ADN.

El marcaje de sondas se ha realizado empleando el sistema no radiactivo de marcaje con digoxigenina, comercializado por Boehringer (Mannheim, Alemania), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Esta técnica consiste, en esencia, en la síntesis parcial de ADN a partir del ADN molde que se quiere usar como sonda. Para ello, se utiliza el ADN molde desnaturalizado por calor (100 °C, 10 min), una mezcla de hexanucleótidos, fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y digoxigenina-dUTP como nucleótido marcado, que se puede detectar mediante una reacción inmunológica específica. Los ADNs usados como sonda fueron tanto fragmentos de restricción purificados como ADN plasmídico linearizado. Se utilizaron, habitualmente, 100-300 ng de ADN desnaturalizado en un volumen de reacción final de 20 µl. El tiempo de incubación fue siempre superior a 6 h a una temperatura de 37°C.

### 4.6.3. Hibridación ADN-ADN con sonda no radiactiva.

El filtro de nylon al que se había transferido el ADN se colocó en un rodillo de hibridación al que se adicionaron 20-40 ml de solución de hibridación (5x SSC, N-lauril sarcosina 0'1%, SDS 0'02%, formamida 50% y agente bloqueante al 2%) y se incubó a 42°C, al menos durante 1 h, en horno de hibridación (Amersham). Después de eliminar la primera solución, se adicionó de nuevo solución de hibridación adicionada con el ADN sonda desnaturalizado (100 °C, 10 min) y se incubó a la misma temperatura durante un tiempo mínimo de 6 h. Terminado el proceso de hibridación, el filtro se lavó primero 2 veces con una solución 2x SSC y SDS al 0'1% (v/v) durante 5 min, y después otras 2 veces con una solución 0'1x SSC y SDS al 0'1% (p/v) a 68 °C durante 15 min. Una vez lavado el filtro, se procedió a la detección inmunológica del ADN hibridado usando anticuerpos específicos contra la digoxigenina. Estos anticuerpos están conjugados con fosfatasa alcalina que, en presencia de CSPD<sup>R</sup> produce un compuesto inestable, el cual se descompone emitiendo luz a una longitud de onda de 477 nm. La emisión de luz se detectó poniendo en contacto el filtro con una película autorradiográfica Kodak X-Omat. El tiempo de exposición (5 min a 3 h)

para la detección de las bandas de hibridación dependió de la cantidad de ADN, del grado de homología de la sonda y de la eficiencia del marcaje de la misma. Para el revelado de la película se usó revelador Neutrol Liquid NE (Agfa) y fijador N FIX 172 (Negra) a las diluciones y tiempos recomendados por las casas comerciales.

## 5. SECUENCIACIÓN

### 5.1. Obtención de cebadores y secuenciación automática.

Ambos se hicieron a través del servicio de secuenciación del Instituto de Parasitología López Neyra (CSIC-Granada) y a través del servicio de secuenciación de Boehringer. En todos los casos, se secuenciaron ambas cadenas del ADN, mediante la técnica de “primer walking”.

### 5.2. Análisis informático de secuencias de ADN.

La lectura de las secuencias de ADN obtenidas se llevó a cabo utilizando el programa EDITVIEW (PERKIN ELMER). La búsqueda de sitios de restricción y localización de posibles ORFs, se hicieron utilizando el programa DNA Strider<sup>R</sup> y Omiga<sup>R</sup>.

La búsqueda de homologías a nivel ADN y proteína con secuencias conocidas presentes en los bancos de datos se realizó mediante Internet con los programas FASTA (Pearson y Lipman, 1988) y BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Para los alineamientos de secuencias se usaron los programas Gap y ClustalW, del paquete de programas CGC de la Universidad de Wisconsin (EE.UU.).

## 6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para llevar a cabo la amplificación de un fragmento de ADN mediante la técnica de PCR, se preparó una mezcla en un volumen total de 50 µl conteniendo: Cl<sub>2</sub>Mg 1.5 mM, dNTPs 0.6 mM, buffer de PCR (10x), 2 unidades de Taq polimerasa, 50 pmoles de cada cebador (leuC-R2 y leuC-F1) y de 100-500 ng de ADN. La amplificación por PCR se hizo

usando 2 primers, leuC-R2 (5'-TAACCGGCTATTTCCACTCG-3') y leuC-F1 (5'-CGACGGAAGTGTCTTCTCT3'), contruidos a partir de la secuencia del banco de genes de *S. meliloti*, en un termociclador Hybaid con las siguientes condiciones:

1 ciclo	94°C durante 5 min
35 ciclos	{ 94°C durante 1 min 55°C durante 1 min 72°C durante 2 min
1 ciclo	72°C durante 2 min

## 7. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS ENTRE CEPAS BACTERIANAS

### 7.1. Cruces simples.

Este tipo de cruces se llevó a cabo para movilizar plásmidos que contienen la región *mob* de RP4 (pSUP2021 y pSUP202); para ello se utilizó como cepa donadora y movilizadora *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983), que contiene los genes de transferencia (*tra*) de RP4 integrados en el cromosoma.

Las transferencias se realizan mezclando un cultivo del donador en fase logarítmica de crecimiento con otro del receptor en fase exponencial tardía, habitualmente en la proporción 1:1. Donador y receptor se recogieron por centrifugación en un tubo de microfuga y tras lavar con medio TY, se resuspendieron en un pequeño volumen de medio de cultivo (50 a 200 µl). La mezcla se depositó sobre un filtro Millipore estéril de 0,45 µm de poro y 2,5 cm de diámetro, previamente colocado sobre una placa de TY, y se incubó durante 16 a 24 h a 28°C. Transcurrido este tiempo, la mezcla de conjugación se resuspendió en medio estéril. Tras efectuar las diluciones adecuadas, se sembraron sobre placas de medio mínimo adicionadas de los antibióticos apropiados.

### 7.2. Cruces triparentales.

La transferencia de plásmidos no autotransmisibles que contienen el *oriT* del plásmido RK2 desde cepas no movilizadoras de *E. coli* a *Rhizobium* se realizó según el

modelo de cruce tripartito, utilizando como plásmido movilizador en *trans* pRK2013 (Ditta *et al.*, 1980). La metodología seguida es idéntica a la de los cruces simples, pero en estos casos se efectuaron mezclas donador:movilizador:receptor en proporciones que habitualmente fueron 1:1:1.

## 8. CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

### 8.1. Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa.

En cepas de *Rhizobium* portadoras de una fusión *nod-lacZ*, los ensayos de expresión se han realizado en medio TY y en medio mínimo (MM). Los cultivos iniciales fueron preparados en medio TY. En el caso de ensayos en MM, los preinóculos son lavados concienzudamente con MM. Se diluyen 50-100 veces los cultivos, con los apropiados antibióticos, con y sin la presencia del inductor correspondiente, luteolina 5  $\mu$ M ( en el caso de *S. meliloti*) ó naringenina 0,4  $\mu$ M ( en el caso de *R. leguminosarum* bv. *viciae*).

Se procedió según el protocolo descrito por Miller (1972) y modificado por Mulligan y Long (1985). Se crecen cultivos hasta una densidad óptica ( $DO_{600}$ ) de 0.3-0.6. A 300  $\mu$ l de cultivo se le añaden 450  $\mu$ l de tampón Z ( $Na_2HPO_4$  60 mM,  $NaH_2PO_4$  40mM, ClK 10 mM,  $MgSO_4$  1mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,05 mM y pH 7), 100  $\mu$ l de cloroformo y 50  $\mu$ l de SDS 0.1% en tampón fosfato para lisar las células. Se agitó con vortex durante 30 segundos y se incubó 5 minutos a 30°C. La reacción se inició por la adición de 200  $\mu$ l de o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) 4 mg/ml. La mezcla se incubó a 30°C. La reacción se para añadiendo 500  $\mu$ l de  $CO_3Na_2$  1 M y se anota el tiempo transcurrido. La muestra se centrifugó durante 5 minutos y se midió la absorbancia a una longitud de onda 420 nm en un espectrofotómetro (Pharmacia). Las unidades Miller se calcularon según la ecuación:

$$U_{\text{Miller}} = \frac{DO_{420} \times 1000}{T \times V \times DO_{600}}$$

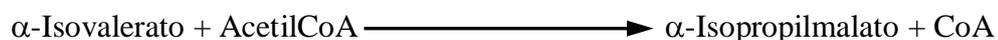
T = tiempo  
V = volumen de cultivo

## 8.2. Determinación de la actividad $\beta$ -glucuronidasa.

Se toman 300  $\mu$ l de un cultivo con una  $DO_{600}$  entre 0.4 y 0.6 y se le añaden 640  $\mu$ l de tampón de ensayo (tampón fosfato sodico 50mM, DTT 5mM y EDTA 1mM), 50 $\mu$ l de SDS 1% y 100 $\mu$ l de cloroformo. Se agita durante 30 segundos y se incuba a 37°C durante 5-10 minutos. Una vez pasado este tiempo se le añade 10  $\mu$ l de PNPG 100 mM(p-nitrofenil $\beta$ -D-glucuronido) precalentado a 37°C. Se anota el tiempo y se incuba a 37°C. Se para la reacción con 200  $\mu$ l de  $CO_3Na_2$  1 M cuando empieza a cambiar de color, y se anota el tiempo transcurrido. Se centrifuga durante 5 minutos y se mide el sobrenadante a una longitud de onda de 405 nm. Las unidades se calculan siguiendo la formula de Miller del apartado anterior.

## 9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD $\alpha$ -IPM SINTASA

La  $\alpha$ -IPM sintasa cataliza la siguiente reacción:



La actividad  $\alpha$ -isopropilmalato sintasa ( $\alpha$ -IPM) fue medida determinando la cantidad de coenzima A (CoA) liberada con ácido 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoico (DTNB ó reactivo de Ellman). Para ello se ha utilizado esencialmente el método descrito por Kohlhaw (1989). Los cultivos celulares fueron crecidos en MM suplementado con glutamato (0.4 g/L) y leucina 0.2 mM hasta una  $DO_{600}$  de 1.2. Los cultivos fueron lavados y resuspendidos en Tris ClH 0.625 M pH 8.5. Las células se rompen usando la prensa de French. Los extractos son lavados por centrifugación a 4°C y el sobrenadante obtenido es el utilizado como extracto libre de células. La cantidad de proteína total utilizada es determinada por el método de Bradford: a alícuotas de 1  $\mu$ L de muestra se le añaden 200  $\mu$ L de reactivo ( Bio-Rad Protein Assay) y se completa hasta 1mL con agua desionizada, se agita vigorosamente y se mide la absorción a 595 nm después de 2 minutos, y antes de 1 hora, frente a un blanco que lleva 200  $\mu$ L de agua desionizada y 800  $\mu$ L de reactivo. La

## Material y Métodos

---

concentración de proteínas presentes en las muestras ensayadas, se calculó por interpolación respecto a una curva estándar que se preparó con albumina bovina.

La mezcla de reacción (125µl) contiene: 20 µL de KCl 0.25M, 10 µL de  $\alpha$ -cetoisovalerato 0.625mM, 10 µL de Acetil-CoA 0.625mM, extracto crudo (150 µg de proteína), y tampon Tris-ClH hasta un volumen final de 125 µL. Después de incubar la mezcla de reacción a 30° C durante 10 minutos, la reacción fue detenida añadiendo 375 µl de etanol seguido de 250 µl de DTNB 1mM en 0.1M Tris ClH pH 8.0. Posteriormente se centrifuga durante 5 minutos y se mide el sobrenadante a 412 nm frente a un blanco sin sustrato. Un coeficiente de extinción molar de 14150 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Sigma D8130) fue usado para realizar los cálculos. La actividad específica se da en unidades por miligramo de proteína, definiéndose una unidad de actividad como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µmol de CoA por minuto.

## 10. ENSAYOS CON PLANTAS

### 10.1. Plantas.

Las plantas utilizadas en este trabajo han sido:

*Medicago sativa* L. (alfalfa), variedad Aragón

*Pisum sativum* (guisante), variedad Lincoln

*Vicia sativa* (veza), variedad Fylón

### 10.2. Solución Nutritiva.

Para cultivos hidropónicos se ha utilizado la solución nutritiva libre de nitrógeno de Rigaud y Puppo (1975) modificada:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0'200 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0'200 g
KCl.....	0'200 g
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0'120 g

Na <sub>2</sub> FeEDTA.....	0'025 g
Agua destilada.....	1000 ml

Micronutrientes:

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	0'018 g
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O.....	0'0022 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0'0030 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O.....	0'049 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0'004 g

El pH se ajusta a 7'5 y se esteriliza a 120 °C durante 20 minutos.

### 10.3. Esterilización y germinación de semillas.

Las semillas de alfalfa fueron esterilizadas en superficie por inmersión en 2'5% de HgCl<sub>2</sub> durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se lavaron 6-7 veces con agua estéril y se dejaron en imbibición durante 2 h. Posteriormente se extendieron en condiciones asépticas sobre papel de filtro humedecido con agua estéril, colocado en placas Petri, y se incubaron en oscuridad a 28 °C durante 24-48 h.

Las semillas de veza fueron esterilizadas en superficie por inmersión en etanol 100% durante 2 min. Después se lavan muy bien con agua esteril. A continuación, se sumergen en una solución hipoclorito de sodio (lejía comercial) durante 7 minutos. Se lavan 7-8 veces con agua estéril y se ponen en imbibición durante 8-10 horas. Transcurrido este tiempo se vuelven a lavar muy bien con agua, y se colocan en condiciones asépticas sobre papel de filtro humedecido, colocado sobre placas de vidrio estériles, y finalmente se dejan en oscuridad a 28°C durante 36-48 horas.

Las semillas de guisante se esterilizaron por inmersión durante 15 minutos en una solución de lejía comercial. Después de lavar con agua estéril varias veces, se sumergen en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 7 % durante 15 minutos. Una vez esterilizado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se lavan muy bien con agua estéril, y se dejan en imbibición durante al menos 2 horas. Después de la imbibición, se vuelven a lavar muy bien, se colocan en condiciones asépticas sobre papel

de filtro humedecido colocado sobre placas de vidrio esteriles, y finalmente se incuban en oscuridad a 28°C durante 36-48 horas.

### 10.4. Cultivos axénicos y ensayos de nodulación.

Se realizó el cultivo axénico de plantas de alfalfa según la técnica descrita por Olivares y colaboradores (1980). Cuando las plantulas de alfalfa recién germinadas alcanzaron 1-2 cm de longitud, se colocaron en condiciones asépticas en tubos de 20x200 mm conteniendo 10 ml de solución nutritiva y un soporte de papel de filtro. Se dejaron los tubos con plantas en la oscuridad durante dos días. Después, para evitar que la luz incida 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  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  (400 a 700 nm) de intensidad luminosa, fotoperíodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), 24°C/18°C de temperatura (día/noche) y 50% de humedad relativa.

Cuando las plantas de alfalfa tienen 9-10 días se inoculan con 1 ml de una suspensión celular de la cepa en estudio. Al menos 12 plantas individuales (1 planta/tubo) se inoculan con cada cepa. Tras la inoculación se registró diariamente el número de plantas noduladas y el número de nódulos formados en cada planta. Se consideró que una planta estaba nodulada cuando en sus raíces existía al menos un nódulo visible. El seguimiento de la nodulación se continuó hasta que todas las plantas estaban noduladas. La infectividad de una cepa se considera en función del tiempo de nodulación y del número de nódulos que forma.

El cultivo de veza y guisante también se llevó a cabo mediante cultivo hidropónico en dispositivos del tipo jarra Leonard (Leonard, 1943) con vermiculita lavada como sustrato inerte, según describe Hervás (1988). En las jarras estériles se siembran axénicamente 2-3 semillas pregerminadas (1-3 cm de radícula) a las cuales se les añade 1 ml del inóculo correspondiente. Se cubren las semillas con vermiculita y con una capa de perlita estéril, lo que disminuye el riesgo de contaminación, evitando a la vez pérdidas de humedad. Finalmente, las jarras se recubren con papel para mantener el sistema radical en oscuridad y se llevan a una cámara de cultivo de plantas. Alternativamente el cultivo de veza y guisante también se llevó a cabo utilizando bolsas de plástico con soporte de papel. Para ello, 2-3 semillas pregerminadas (1-3 cm de radícula) son introducidas en pequeños orificios, que previamente, se habían realizado en el soporte de papel, de manera que las

plántulas, al crecer, desarrollan todo el sistema radical en el interior de las bolsas de plástico y la parte aérea fuera de las mismas. De esta manera se crea un sistema axénico para la inoculación con la cepa correspondiente y posterior adición de la solución nutritiva. Las bolsas de plástico, una vez que las plántulas han sido colocadas, se sujetan mediante un sistema de carpetas, tipo archivador, manteniendo en oscuridad al sistema radical.

### **10.5. Cuantificación de aminoácidos secretados por raíces de alfalfa.**

Los aminoácidos secretados por las raíces de alfalfa y acumulados en la solución nutritiva se determinaron mediante HPLC en fase reversa según Farfan et al. (1996). La solución nutritiva procedente de tubos que contenían plantas con 20 días de antigüedad fue concentrada mediante evaporación en un rota vapor hasta un volumen final de 1 ml.

Después de la derivación de aminoácidos con O-ftaldialdehido, las muestras fueron inyectadas en una columna C18 “Waters Resolve” (3.9x150 mm) conectado a un “HPLC Waters” con un inyector automático “Waters 715 Ultra Wisp” y un detector fluorescente “Waters 420”. El sistema fue controlado con el programa “Waters Baseline 810”. Los aminoácidos se separaron mediante el uso de un gradiente lineal desde el 100% de un solvente A (metano, tetrahidrofurano, y un tampón compuesto por 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50mMNaAc, pH 7.5, en un porcentaje 2:2:96) hasta el 100% de un solvente B (metanol:agua, 65:35) durante 33 minutos.

## RESULTADOS

---

## 1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE *S. MELILOTI* AUXOTROFOS PARA LA LEUCINA.

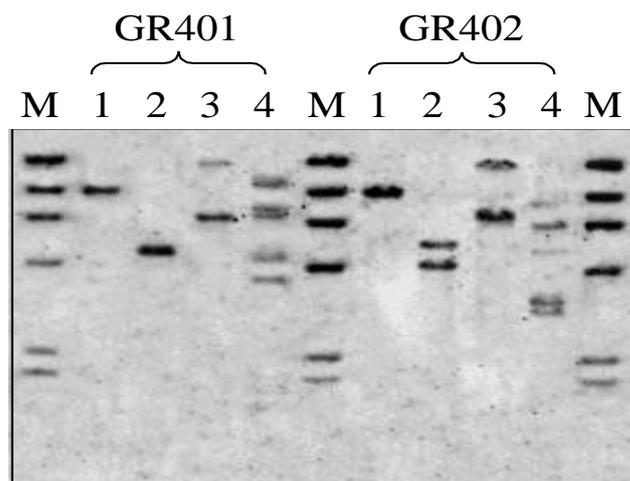
Los trabajos iniciales sobre la relación entre requerimientos nutritivos (auxotrofias) de *Rhizobium* y el establecimiento de la simbiosis indicaban que los auxotrofos para leucina de *S. meliloti* eran capaces de formar nódulos en raíces de alfalfa, si bien estos nódulos no eran fijadores de nitrógeno y carecían de bacterias en su interior (Denariè *et al.*, 1976; Truchet *et al.*, 1980). Posteriormente, George y Roberts (1991) publicaron que cepas Leu<sup>-</sup> de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* también forman nódulos vacíos. Sin embargo, en ningún caso se caracterizaron los genes alterados en dichos mutantes, con lo que no se pudo confirmar una relación directa entre la auxotrofia y el fenotipo simbiótico descrito. Por esta razón, se inició el aislamiento de mutantes Leu<sup>-</sup> derivados de *S. meliloti* GR4 para su posterior estudio y caracterización genética.

La cepa GR4 de *S. meliloti* fue mutagenizada aleatoriamente con el transposón Tn5, utilizando el vector pSUP2021. La frecuencia de aparición de transconjugantes resistentes a la kanamicina fue de  $5 \times 10^{-6}$ . Las colonias de transconjugantes, seleccionadas en medio mínimo (MM) suplementado con 1mM de L-leucina y kanamicina, fueron replicadas en el mismo medio carente de leucina, al objeto de identificar aquéllas que necesitan de este compuesto para crecer. De un total de 5.000 transconjugantes ensayados, sólo dos de ellos fueron identificados como cepas Leu<sup>-</sup>, puesto que requerían de leucina en el medio para su crecimiento. Estas cepas fueron denominadas GR401 y GR402, respectivamente. Se comprobó que estos dos mutantes necesitaban leucina para crecer, aunque también crecían en MM suplementado con un precursor de la leucina,  $\alpha$ -cetoisocaproato ( $\alpha$ -KIC). Sin embargo, fueron incapaces de crecer en un MM suplementado con otros dos compuestos intermediarios en la ruta de biosíntesis de leucina, el  $\alpha$ -cetoisovalerato ( $\alpha$ -KIV) y el  $\alpha$ -isopropilmalato ( $\alpha$ -IPM). Estos datos indicaban que los mutantes GR401 y GR402 estaban alterados en la ruta biosintética de la leucina.

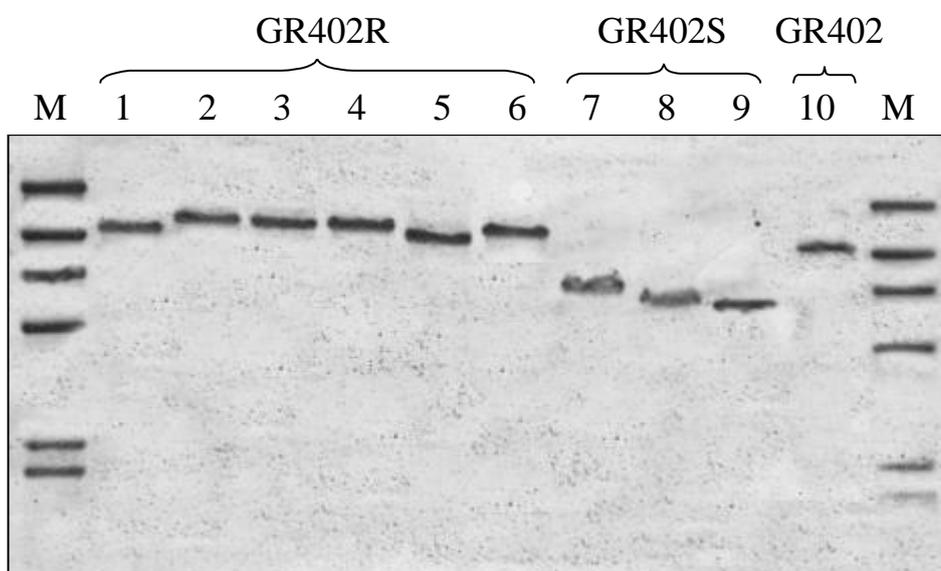
Mediante hibridación del ADN genómico frente a una sonda de ADN de Tn5, se comprobó que cada una de estos dos mutantes presentaba una única copia del transposón en su genoma (Fig. R.1). En ambos casos la inserción del transposón había ocurrido sobre un mismo fragmento de ADN, de aproximadamente 4 kb, si bien se trataba de eventos de inserción diferentes (Fig. R.1).

Se determinó la frecuencia de reversión a la prototrofia de ambos mutantes, mediante el recuento de colonias capaces de crecer en MM carente de leucina, y en ausencia de antibióticos. Mientras que no se pudo aislar ningún revertiente derivado de la cepa GR401, se determinó que la cepa GR402 presentaba una alta frecuencia de reversión a prototrofia, superior a  $10^{-6}$ . La mayoría (93%) de estos revertientes eran sensibles a la Km, mientras que el resto continuaban siendo resistentes a este antibiótico. Los ADNs genómicos de algunos de estos revertientes fueron hibridados frente a ADN del Tn5 para verificar si todavía presentaban secuencias del transposón en su genoma. Los revertientes sensibles a Km presentaron una única banda de hibridación de menor tamaño que en la cepa GR402, lo que indicaba que en estas cepas la reversión había ocurrido por excisión del transposón (Fig. R.2). Sin embargo, los revertientes Km<sup>r</sup> presentaron una banda de hibridación de tamaño similar o ligeramente superior a la de la cepa parental GR402 (Fig. R.2). Es posible que en este segundo grupo de cepas la reversión haya ocurrido por la aparición de mutaciones secundarias, localizadas en alguna otra parte del genoma, aunque no pueden descartarse otros eventos más complejos, tales como la excisión y posterior reinserción del transposón fuera de su localización original.

Posteriormente se clonaron en el vector pUC18 los fragmentos *EcoRI* que contenían el Tn5 en cada una de las cepas Leu<sup>-</sup> GR401 y GR402. Esto facilitó el mapeo de las inserciones así como la secuenciación del ADN adyacente a ambos brazos del transposón en cada mutante. Los resultados mostraron que en ambos mutantes el Tn5 estaba interrumpiendo el mismo gen, y que ambas inserciones estaban separadas por unos 700 pb (Fig. R.3). El análisis de la secuencia obtenida y su comparación con secuencias depositadas en las bases de datos determinó que el gen alterado en ambos mutantes presentaba homología a genes que codifican para  $\alpha$ -isopropilmalato ( $\alpha$ -IPM) sintasa en diferentes organismos, procariontes y eucariotes. La  $\alpha$ -IPM sintasa participa en el primer paso de la ruta específica de la biosíntesis de leucina, catalizando la síntesis de  $\alpha$ -isopropilmalato a partir de  $\alpha$ -cetoisovalerato y acetil-CoA. Estos resultados demostraban que la cepas Leu<sup>-</sup> aisladas estaban efectivamente alteradas en la ruta biosintética de la leucina.

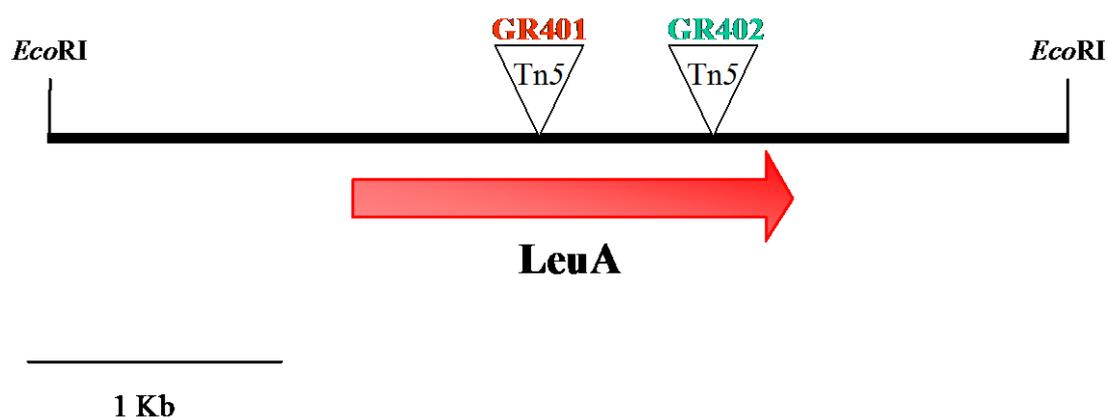


**FIGURA R.1.** Hibridación de los ADNs genómicos de las cepas GR401 y GR402 frente a ADN de Tn5. Los ADNs fueron digeridos con: 1) *EcoRI*; 2) *EcoRI-BamHI*; 3) *BamHI*; 4) *Sall*; M)  $\lambda$ -*HindIII*.

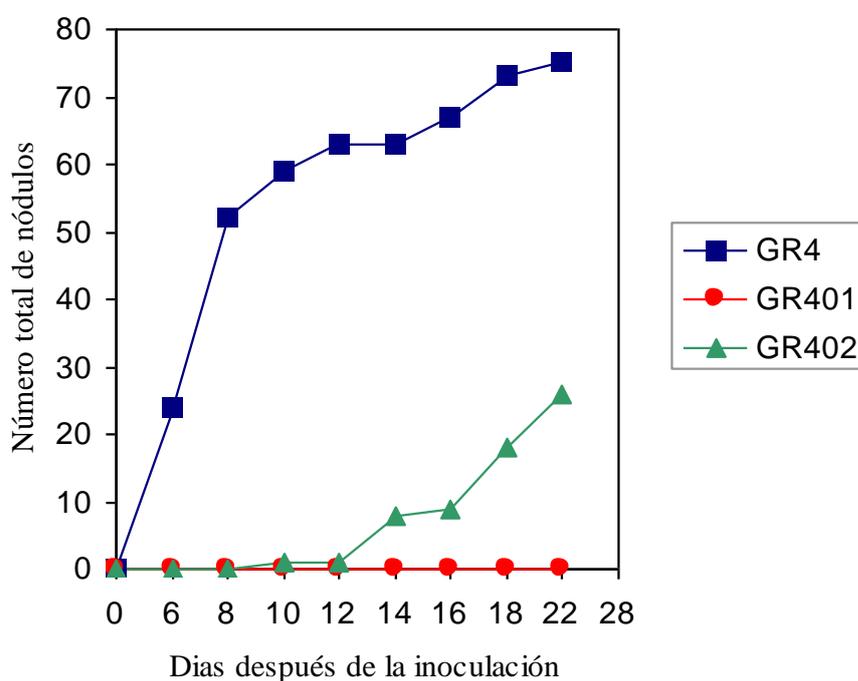


**FIGURA R.2.** Detección del transposón Tn5 en revertientes prototrofos derivados de la cepa GR402. Los ADNs de distintos revertientes, resistentes (GR402R) o sensibles a kanamicina (GR402S), fueron digeridos con *EcoRI*, sometidos a electroforesis e hibridación frente a ADN de Tn5. M)  $\lambda$ -*Hind III*.





**FIGURA R.3. Localización del Tn5 en los mutantes GR401 y GR402.** Se muestra la posición del transposón dentro del fragmento *EcoRI* de 4 Kb y en relación al gen *leuA*.



**FIGURA R.4. Nodulación de raíces de alfalfa por cepas de *S. meliloti* auxotrofas para leucina (GR401 y GR402).** Se muestra el número total de nódulos formados por cada cepa durante un periodo de 22 días.



Se estudió el comportamiento simbiótico de ambas cepas Leu<sup>-</sup> en raíces de alfalfa. Mientras que las plantas inoculadas con la cepa GR401 fueron incapaces de formar nódulos, aquellas plantas inoculadas con GR402 formaron tardíamente nódulos pequeños, esféricos y blancos, no fijadores de nitrógeno, en contraste con los nódulos de mayor tamaño, ovalados y de color rosado formados por la cepa silvestre (Fig. R.4). Estos datos indicaban que a pesar de que ambas cepas Leu<sup>-</sup> presentaban una alteración genética parecida, su fenotipo simbiótico era ligeramente diferente. Mientras que GR401 era incapaz de formar nódulos en alfalfa (fenotipo Nod<sup>-</sup>), GR402 formaba nódulos no fijadores de manera bastante menos eficiente que la cepa silvestre (fenotipo Nod<sup>+</sup> Fix<sup>-</sup>). En realidad la cepa GR402 presentaba un fenotipo simbiótico muy parecido al descrito para mutantes Leu<sup>-</sup> de *S. meliloti* y *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Truchet *et al.*, 1980; George y Robert, 1991). Por otra parte, todos los revertientes prototrofos derivados de GR402 formaron nódulos fijadores de nitrógeno en raíces de alfalfa, lo que indicaba una relación directa entre la auxotrofia para leucina y los defectos simbióticos observados.

## **2. CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN LEUA DE *S. MELILOTI* GR4**

Se utilizó una genoteca de la cepa GR4 para la complementación genética de la auxotrofia de los mutantes GR401 y GR402. Los cósmidos de la librería de genes fueron introducidos en cada mutante mediante conjugación triparental en masa, y se seleccionaron colonias transconjugantes capaces de crecer en MM con Km, Tc y sin leucina. De esta forma se aislaron dos cósmidos, pRm4013 y pRm4023 que permitían crecer a ambos mutantes en MM sin leucina, y por tanto complementaban el defecto genético de estas cepas. Ambos cósmidos compartían varios fragmentos de restricción, entre ellos un fragmento *EcoRI* de 4 kb (Fig. R.5). Se comprobó, como se verá más adelante, que este fragmento contiene el gen *leuA* alterado en las dos cepas mutantes GR401 y GR402.

Se clonó el fragmento *EcoRI* de 4 kb en el vector pUC18 y se obtuvo su secuencia de nucleótidos en ambas cadenas. La secuencia de nucleótidos completa de este fragmento se muestra en la Figura R.6. El análisis de la secuencia permitió identificar 4 posibles marcos abiertos de lectura (ORFs), esquematizados en la Fig. R.7. Uno de ellos, LeuA, codifica para una proteína de 569 aa, cuya secuencia muestra homología con  $\alpha$ -IPM sintetas de diversos organismos. Sobre la secuencia completa, LeuA de *S. meliloti* GR4

## Resultados

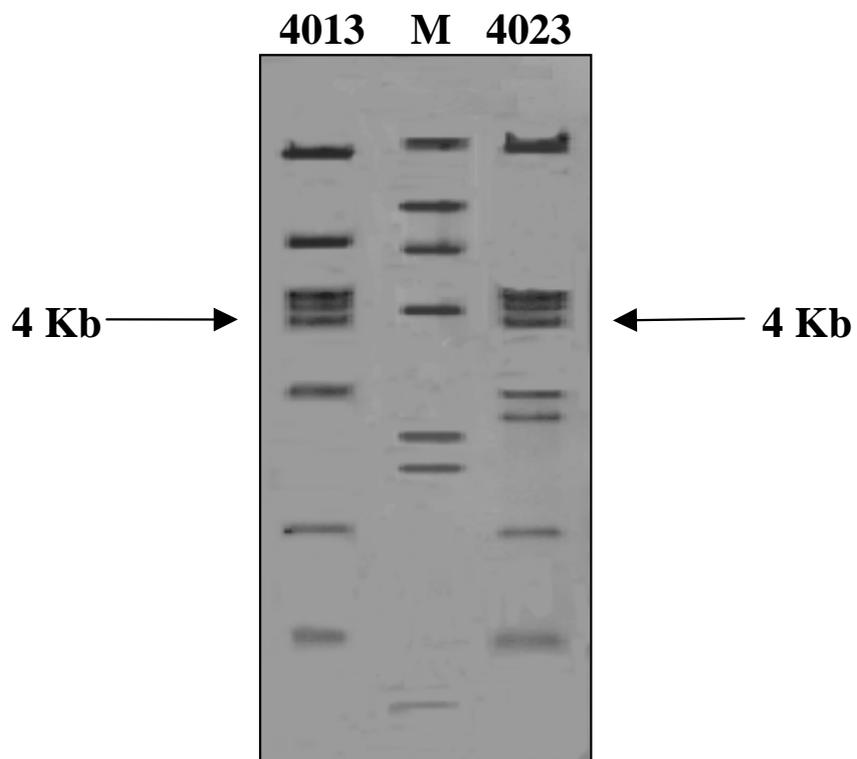
---

muestra un 55% de identidad con LeuA de *Corynebacterium glutamicum*, un 53% de identidad con LeuA de *Mycobacterium tuberculosis*, y un 46% de identidad con Leu4 de *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, la homología de secuencia fue bastante menor con respecto a  $\alpha$ -IPM sintasas de bacterias Gram-negativas. Así, LeuA de *S. meliloti* y *Escherichia coli* solo comparten un 24% de identidad en su secuencia de aa, mientras que la identidad baja hasta el 21% cuando se compara con LeuA de *Salmonella typhimurium*. El alineamiento de la secuencia de LeuA de *S. meliloti* con algunas de estas proteínas se muestra en la Fig. R.8, donde puede apreciarse que la secuencia de LeuA de *S. meliloti* queda en una posición intermedia entre las secuencias de las  $\alpha$ -IPM sintasas de bacterias Gram-positivas y de levaduras.

La proteína LeuA de *S. meliloti* contiene los dos motivos de aa conservados en las  $\alpha$ -IPM sintasas y homocitrato sintasas descritas hasta el momento (Wang et al., 1991). El primero de estos motivos, localizado en el extremo N-terminal de este tipo de proteínas (LRDGXQX<sub>10</sub>K) corresponde a los residuos 48-64 de la proteína LeuA de *S. meliloti*, mientras que el segundo dominio conservado se extiende entre los residuos 250 a 263 (VSLPHDRGTGIA), e incluye dos histidinas que parecen ser importantes para la actividad catalítica de la enzima (Fig. R.6).

Arriba de *leuA* se identificó un ORF que codificaría para una proteína de 195 aa, cuya secuencia muestra una fuerte homología con ClpP de diversas bacterias, proteína que corresponde a la subunidad catalítica de la serín-proteasa CLP, proteasa dependiente de ATP (Figs. R.6 y R.7). En la Fig. R.9 se muestra el alineamiento de la secuencia de ClpP de *S. meliloti* y las correspondientes ClpPs de otras bacterias. ClpP de *S. meliloti* muestra un 57%, 49% y 41% de identidad con ClpP de *Pseudomonas aeruginosa*, *Paracoccus denitrificans* y *E. coli*, respectivamente.

Corriente abajo de *leuA* se identificaron dos pequeños ORFs, denominados Orf83 y Orf142 (Figs. R.6 y R.7). La secuencia de estas dos posibles proteínas muestra cierta similitud (alrededor del 30% de identidad), con los correspondientes miembros de dos parejas de proteínas putativas identificadas en el genoma de *M. tuberculosis*. Estas parejas de proteínas, Rv0623-Rv0624 y Rv0608-Rv0609 (números de acceso en EMBL/GenBank



**FIGURA R.5.** Perfil de restricción *EcoRI* de cósmidos que complementan la auxotrofia de cepas  $Leu^-$  de *S. meliloti* GR4. Se indica el fragmento de 4 Kb que contiene el gen *leuA*. M)  $\lambda$ -*HindIII*.



10 30 50 70 90  
 GAATTCCTGGATTCCGGTTGTTGGAGATCAGGCAAGCCGTTGCAACGTATCGTACGGCGCGCGGTGGTTCGCATTGTTTTCGCCGTCG

110 130 150 170  
 AGTCGCATTATCTGGTTGGAAGACATTTTCATGAGGAGTCCGAAGAATGCGGAACGACGACGACCAGGAAGAAAAGAAGACCGAATTGCCG  
 M R N D D D Q E E K K T E L P

**ClpP →**

190 210 230 250 270  
 CTCGGCAAGGAGACGGAGCGAACCTTTTCAAGTCGCGTTCGATTTTCATTTACGGAACGATCACCCAGGAATTGGCGCAGAAGTCTGC  
 L G K E T E A N L F K S R S I F I Y G T I T Q E L A Q K V C

290 310 330 350  
 TCGCAGCTCGTGGCGCTCGCCGCGGCCAGCGACGATATCCGCCTATTCGTCAACTCGCCGGGCGGCCATGTCGAATCCGGCGACAGC  
 S Q L V A L A A A S D D D I R L F V N S P G G H V E S G D S

370 390 410 430 450  
 ATCCACGACATGATCAAGTTCGTGAAGCCGAAGGCTGGACCATCGGCACAGGCTGGGTCGCGTCCGCGCGCTCATCTATGTCGCC  
 I H D M I K F V K P K V W T I G T G W V A S A G A L I Y V A

470 490 510 530  
 GCGCCGAAGGAGCAGCGCTGTGCTGCGGAACACCCGCTTCTGTGTCACCAACCTCGGGCGGCACGCGCGCATGGCTTCCGACATC  
 A P K E Q R L C L P N T R F L L H Q P S G G T R G M A S D I

550 570 590 610 630  
 GAGATCCAGGCGCGAGATCATCAAGATGAACGAGCGTCTGAACCGGATCTTCTCCGAAGCGACCGGACAGCCGGTCGACAAGATCGCC  
 E I Q A R E I I K M N E R L N R I F S E A T G Q P V D K I A

650 670 690 710  
 AAGGACACGGATCGCGATTACTGGCTCGGTGCGGAAGAGGCGAAGGCCTACGGTCTCGTTTCGCGCATCGTCACCTCCATCGCGGAGATT  
 K D T D R D Y W L G A E E A K A Y G L V S R I V T S I A E I

730 750 770 790 810  
 TAGTCCGGCGCGCAAGGGCGGCCGCTCATCCGCTGCTGCACCTTCTCCCGCAAGCGGGCGAGGGGAGCGCGCGCCGCTCAGT  
 \*

830 850 870 890  
 CCCCTTCCCCCGCGGGGAAAGGGCTAGTCTCGGTTCAAACCCGAGGAGAGGCACTTGTCTCGCTTTACCAAGCCGTGTATAGG

910 930 950 970 990  
 CTTTTTATGACTCAGGCTGACGCACACAAGATCGCAGCGATCTCTCCGGACACGATGCCAATCGTGATCCTGCGCGCGCCACCGCATCC

1010 1030 1050 1070  
 CTTCTTCTTTCGCGCTTATCCGCGGTTGCCGGGTTTCGCTGAGGAGCGCCCGCGCGGCGAAAAGCCTTGCCGGCACCTGCTCCTCGAAAT

1090 1110 1130 1150 1170  
 CCAGAAAAGCTGAACCAATCGCGCGGCCCGCGGCATCGCCATCGCAATGTCCCGAATGATCGGCTATTGCATGCGCGAGGCTACGGT

1190 1210 1230 1250  
 CAAGTGACGAAGAGAAGCTGCACATGATTTTTGAAATCACATTCATCAAGACCGGCATGCCGAGGCGGCTGTGAAATATCAGCCCTATC  
 M I L K S H S I K T G M P E A A V K Y Q P Y P

**LeuA →**

1270 1290 1310 1330 1350  
 CGCAGATCGTGTCCCGGATCGCACGTGGCCGTCAAAGGCGATCACCGAGGCGCCTATCTGGTGTTCGTTGGATCTGCGCGACGGCAACC  
 Q I V L P D R T W P S K A I T E A P I W C S V D L R D G N Q

1370 1390 1410 1430  
 AGGCGCTCGTCGATCCGATGGGTACGACCGGAAGGCGCGCATGTTCACCTCCTCCTGGACATGGGCTTCAAGGAGATCGAGATCGGCT  
 A L V D P M G H D R K A R M F H L L L D M G F K E I E I G F

1450 1470 1490 1510 1530  
 TCCCGTCCGCGTCGACGAGGATTACGATTTCCGCGCTGGTGGCTCGAGGAAGCAACGTTTCCGAAGACGTGTCCCTGCAGGTGCTGG  
 P S A S Q T D Y D F A R W C V E E G N V S E D V S L Q V L V

1550 1570 1590 1610  
 TCCAGTCCGCGCGGAAATTGATCGCGCGGACCTTCGAGGCGCTTGAAGGTGCGCACCGCGGATCGTACATTTCTACAAATTCGACGAGCG  
 Q C R P E L I A R T F E A L E G A H R P I V H F Y N S T S E

1630 1650 1670 1690 1710  
 AGTGCAGCGCCGCTCGTCTTCGGCAAGGACGTGGCCGGCATCAAGCAGATCGCGACTGACCCGCCAAGATGATCACCGACATGGCCG  
 L Q R R V V F G K D V A G I K Q I A T D A A K M I T D M A A

1730 1750 1770 1790  
 CGAAAGCGGGCGGCTTATCGCTTCGAATACTCGCCGGAAGGCTTCCCGGCACCGAAGTTCGAAGTGGCATTGGAGATTTGCAACGCCG  
 K A G G G Y R F E Y S P E S F T G T E L E V A L E I C N A V

1810 1830 1850 1870 1890  
 TGATCGAGATCGTACGGCCGACGCGGACAACAAGCTCATCATCAACCTGCCCTCGACCGTGGAGATGGCGACGCGCAACATCTATGCCG  
 I E I V R P T A D N K L I I N L P S T V E M A T P N I Y A D

1910 1930 1950 1970  
 ACCAGATCGAATGGATGTCCGCAATCTCGATAATCGGAGAACCTGATCGTCTCGCTGCATCCGCACAACGATCGCGGACCGGCATTG  
 Q I E W M C R N L D N R E N L I V S L H P H N D R G T G I A

1990 2010 2030 2050 2070

# Resultados

CCGCCACCGACCTGGGGCTGATGGCGGGCGCCACCCTGTGCGAGGGACGCTCTTCGGCAATGGCGAGCGCACGGCAACGTCGATGTGG  
A T D L G L M A G A D R V E G T L F G N G E R T G N V D V V

2090 2110 2130 2150  
TGACGCTGGCGCTCAACATGTTACGCAGGGCGTCGATCCCAAGCTCGACTGCTCGGACATCGAGCGGATCAAGGAAGTCTACGAATATT  
T L A L N M F T Q G V D P K L D C S D I E R I K E V Y E Y S

2170 2190 2210 2230 2250  
CCAACCAGATGGTCATTCCGGAACGCCACCCTATGTAGGCGAACTGGTCTACACGGCCTTCTCCGGCTCGCATCAGGATGCCATCAACA  
N Q M V I P E R H P Y V G E L V Y T A F S G S H Q D A I N K

2270 2290 2310 2330  
AGGGCATGAAGCGATCAAACAGGCGAACAGCCGACCTGGGAGGTACCCTATCTGCCGATCGATCCGCGCGATGTCGGACGCAGCTACG  
G M K A I K Q A N K P T W E V P Y L P I D P R D V G R S Y E

2350 2370 2390 2410 2430  
AAGCGATCATCCGCATCAACTCGCAATCGGGCAAGGCGGCATCGCTATATCTGCAGGAGACTACGGTATCAATCTGCCGCGCAATC  
A I I R I N S Q S G K G G I A Y I L Q E D Y G I N L P R N L

2450 2470 2490 2510  
TGCAGATCGAGTTCCTGAGGAAGTCCAGCGCATTACCGACGAGGAAGGCAAGGAGCTGCCCTCGAAGCGCATCCATCAGCGCTTCATCG  
Q I E F R E E V Q R I T D E E G K E L P S K R I H Q R F I E

2530 2550 2570 2590 2610  
AAAGCTATGTCGAGCAGCCGGGGCGCGCATCAAGTTCGTCGACCATCACACCTACCCGGCAGGGGAGCACAAGGGCTGCGCGTTCGTTG  
S Y V E Q P G A R I K F V D H H T Y P A G E H K G L R V V A

2630 2650 2670 2690  
CCGCCAAATCAGGATGGCGGCGAGACCAGGCGATCGAGGGCAAGGCGCACGGGCCGATCGACGGCTTCATCAATCGCTGTGATCT  
A E I T D G G E T R Q I E G K G T G P I D G F I N A L S I Y

2710 2730 2750 2770 2790  
ATCTCGGCATCGAACTCTCGGTGGCGGATTAATCCGAGCATTGCTGCAGCATGGTTCGAACCGCGCTGCGATCGCTATGTCGAGGTCG  
L G I E L S V A D Y S E H S L Q H G S N A A A I A Y V E V E

2810 2830 2850 2870  
AGTATCCGGCGCAAGCTCTTCGGCGTCGGTATCAACACCAATATCGTGGCCGCTCACTGGAGCGATCGTCTCGGCTGCCAACCCGG  
Y P G G K L F G V G I N T N I V A A S L E A I V S A A N R V

2890 2910 2930 2950 2970  
TGCTGGACGTGGTGGGAAAGTACGCACTTGTCTCGTATGGCCCTTGCCCTGACCCCTCTCCGCGTGGGGGAGAGGGGGAACGCC  
L D V V G K \*

2990 3010 3030 3050  
CATTGAACTTGATTTCTATAGTGGGCTATCCGTTTCGGTATATAAGGATATCCGCGAAAGGATATCTTATGGCTCTCTACATCAAAGA  
M A L Y I K D  
**Orf83** →

3070 3090 3110 3130 3150  
TCCCACCGTGGACCGAATGGCGGAAAACCTTCAAGAACGCCTAGGTGTCGCCACCAAGACAGATGCTGTCCGCATTGCTCTGCAACACGA  
P T V D R M A E K L Q E R L G V R T K T D A V R I A L Q H E

3170 3190 3210 3230  
ACTGGATCGTGTGGAAGACGAAATTCGCTGCGCGAAAAGCTGCGCCCTTGCGGCAACAGGCGCGGACCGGCTAGGCCCGCTGTTC  
L D R V E D E I P L R E K L A A L R Q Q A R D R L G P P V H

3250 3270 3290 3310 3330  
CGGGATCGATGAAAAAGCTTATGGATGAGCTTTGGGAGGAGGGCGAGTGCATCGTCGACGCCCTCCGTCATCGTTGCGATATTGAAC  
G I D M K K L M D E L W E E G E \*  
V S F V D A S V I V A I L N  
**Orf142** →

3350 3370 3390 3410  
GAGGAACCCGGCTTTGAGGAATTGGAAGCGCCTGAGCGACGCGGGAAGCTCTGCGTTTCGCGCTCGTGCCTTTTCGAGGCGGTC  
E E P G F E E L E K R L S D A D G K L C V S P L V R F E A V

3430 3450 3470 3490 3510  
GCCGCACTACGAGACTGCGCATCATCGCCACGAAGGGCAAAGCAGATCGCAGCGATTTGATTGGCGAAGCCCGTGAGTTGGTCGACAGC  
A A L T R L R I I A T K G K A D R S D L I G E A R E L V D S

3530 3550 3570 3590  
TTCATTGAGCACTCAGTGCAGCGAGGTCACGATCGATTCCCACAGGGCGTTCGCGCCCTCGATGCGATGGCCCGCTACGGGAAAGTC  
F I Q A L S A S E V T I D S H T G V R A L D A M A R Y G K V

3610 3630 3650 3670 3690  
GCGGGCCACCCGGCGGCCATAATCTCGGTGATGTTTCGCTATGCGGCCGCAAGGAGTCTGGGCTGACCCATGATCTACAAGGGGAAT  
A G H P A A L N L G D C F A Y A A A K E S G L T L I Y K G N

3710 3730 3750 3770  
GATTTCTCGCAAACCGACCTGGGTTAGAGCACTTGCCTTTCTCCGAAAAGCGAAATGCTTCCAACATTGACTCATATGCGATAGCCC  
D F S Q T D L G \*

3790 3810 3830 3850 3870  
TGCTCTATGGGCGAAGGTCGCGCGCGCTCGGGCAGTTCCTCGGTGTTGATCAGTCTCAAATATTCGCCCGCACCGTTTCGGCAAGG

```
          3890          3910          3930          3950
TCCTGCAGAGCGGGATCGGATGACGGTCCGATCATCACGAATGAGACGCCTTCCCGTTCCCAGGAGACCAAGCCGAGGTCGCCGCGGATG
          3970
GTCTCGCTGAATTC
```

**FIGURA R.7. Secuencia de nucleótidos del fragmento *EcoRI* de 3974 pb que contiene el gen *leuA* de *S. meliloti* GR4. Se muestra también la secuencia de aa de los ORFs identificados: ClpP, LeuA, Orf83 y Orf142. Los asteriscos (\*) indican codones de terminación de la traducción.**

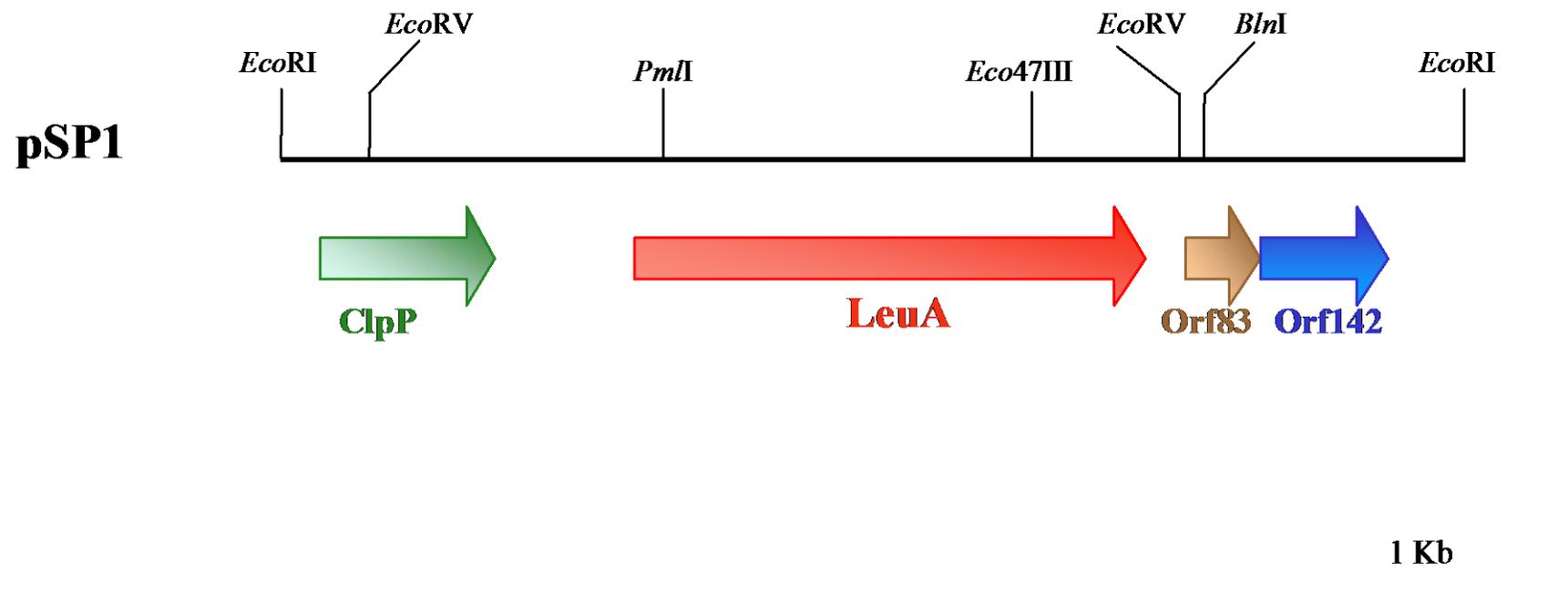


FIGURA R.7. Mapa genético del fragmento *EcoRI* de 3974 pb. Se indican los ORFs identificados.









## Resultados

SMCLPP	1	.....MRNDDQEEKK.....TEPLPGKETEANLFKRSIFLYGTITQELAQK..VCSQLVALAAASDD.DIRLFVNSPGG
PDENCLPP	1	...MAKISTWTTMTTMTTSAARKGLRTRGSACPRATRSASSISSRAQVIVAGPITDKLAQR..TVAHLALAEDSDE.PINMLISSPGG
PACLPP	1	.....MKTDDKREGGD.....SHGAIGAKLMEYALKVRKVFTGGVDEKMAKDVFTVQQLHLIASISDD.PIYMFVNSPGG
ECOLICLPP	1	MSYSGERDNFAPHMALVPMVIEQT.....SRGERSFDIYSRLLKERVIFLTGQVEDHMANL..IVAQMLFLEAENPEKDIYLYINSPGG
SMCLPP	69	HVESGDSIHDMIKFVKPKVWTIGTGWVASAGALIYV..AAPKEQRLCLPNTRFLLHQPSGGTRGMASDIEIQAREIIKMNERLNRIFSEA
PDENCLPP	84	HVESGDMIHDVIKfirptvrtiglawvasagalifv..GADKENRYCLPNTRFLIHQPSVGIgGTSTDMIQAEQVRLMRDLNQIFAEA
PACLPP	72	HVESGDMIFDAIRFITPKVIMIGSGSVASAGALIYFTAADKENRYSLPNTRFLLHQPSGGIQGPASNIEIYRREIVRMKERLDRIFAEA
ECOLICLPP	83	VITAGMSIYDTMQFIKPDVSTICMQQAASMGAFLLT..AGAKGKRfCLPNsrVMIHQPLGGYQqATDIEIHAREILKVKGRMNELMALH
SMCLPP	157	TGQP..VDKIakDtdrdyWLGAEeAKAYGLVSRIVTSIAEI.....
PDENCLPP	172	TGQP..VERIEkDtQRDFWLNtQeALDYGLLGKVIRSVDELK....
PACLPP	162	TGQTPEFTKISADTERDFWLNAEeAVQYGLVNKIIVSEREITLPGQ
ECOLICLPP	171	TGQS..LEQIERDTERDRFLSAPEAVEYGLVDSILTHRn.....

**FIGURA R.9. Alineamiento de la secuencia de aa de ClpP de distintos organismos.** El alineamiento se realizó con el programa Clustal W. En color rojo aparecen los aa conservados en al menos 3 de las secuencias, en azul los cambios conservativos, y en color gris se muestran los cambios no conservativos. SM, *S. meliloti*; PDEN, *Paracoccus denitrificans*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*; EC, *E. coli*.



Z92772 y Z97182, respectivamente), muestran la particularidad de que el codón de terminación de la primera de ellas solapa con el codón de inicio de la traducción de la segunda, circunstancia que también se da en el caso de la pareja ORF83-ORF142 identificada en *S. meliloti*. Se desconoce el posible papel de estas proteínas. ORF142 también muestra homología con diversas proteínas de función desconocida presentes en distintas localizaciones en el genoma de *M. tuberculosis* (datos no presentados).

Los resultados de una búsqueda de secuencias homólogas a LeuA de la cepa GR4 en el servidor público de la secuencia completa del genoma de la cepa 1021 de *S. meliloti* (actualizado a 4 de noviembre de 2000), mostraron la existencia de dos proteínas anotadas como posibles  $\square$ -IPM sintasas, ambas codificadas en el cromosoma de *S. meliloti* 1021. Una de ellas, denominada SMc02717, parece corresponder a la proteína  $\square$ -IPM sintasa identificada en este trabajo, con la que muestra un 99% de identidad. La segunda posible proteína anotada como  $\square$ -IPM sintasa, denominada SMc2546, muestra sólo un 22% de identidad (40% de similitud) de secuencia con la  $\square$ -IPM sintasa de la cepa GR4 caracterizada aquí. Aunque la anotación de la secuencia del genoma de *S. meliloti* 1021 es todavía preliminar, hay que indicar que en el caso de que ambas proteínas se expresen, solamente la proteína identificada en este trabajo parece poseer actividad  $\square$ -IPM sintasa, puesto que, como se verá más adelante, cepas *leuA* derivadas de *S. meliloti* 1021 son auxotrofas para leucina.

### **3. CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS AUXOTROFAS DE *S. MELILOTI* PORTADORAS DE UNA DELECIÓN DEL GEN *LEUA***

Dado que los dos mutantes de Tn5 descritos anteriormente mostraban un comportamiento ligeramente distinto en su interacción con raíces de alfalfa, y con objeto de determinar claramente el fenotipo simbiótico de cepas *leuA* de *S. meliloti*, se construyó una cepa en la que la mayor parte de este gen estaba delecionado. Para ello, se reemplazó un fragmento *PmlI-Eco47III* interno al gen *leuA* de la cepa GR4, por un gen de resistencia a kanamicina, como se esquematiza en la figura R.10. La idoneidad de la mutación, fue verificada mediante hibridación del ADN genómico de la cepa frente a una sonda de *leuA*, así como frente a una sonda correspondiente al gen de resistencia a Km introducido (Fig. R.11).

## Resultados

Se estudió el comportamiento en vida libre de la cepa *ΔleuA* GR410. Como era de esperar, GR410 se comportó como una auxotrofa para la leucina, y al igual que los mutantes por inserción de Tn5, carecía de actividad  $\alpha$ -IPM sintasa (Tabla R.1). GR410 sólo pudo crecer en medios suplementados con leucina o con el precursor de ésta,  $\alpha$ -cetoisocaproato ( $\alpha$ -KIC). GR410 no mostró crecimiento en medios suplementados con el intermediario metabólico  $\alpha$ -KIV, puesto que la mutación provoca la pérdida de actividad  $\alpha$ -IPM sintasa, y por tanto esta cepa es incapaz de convertir el  $\alpha$ -KIV en  $\alpha$ -IPM (Tabla R.1). Sorprendentemente, la cepa GR410 tampoco mostró crecimiento en medios suplementados con  $\alpha$ -IPM, el producto de la actividad  $\alpha$ -IPM sintasa. Esta ausencia de crecimiento se mantuvo incluso en medios que contenían hasta 10mM de  $\alpha$ -IPM. Aunque es posible que la mutación tenga algún efecto polar sobre genes situados abajo de *leuA*, que podrían estar implicados en el metabolismo de  $\alpha$ -IPM, esta posibilidad puede ser descartada puesto que tanto la prototrofia como la actividad  $\alpha$ -IPM sintasa fueron recuperadas tras la introducción en GR410 de un plásmido que contenía exclusivamente un gen *leuA* (pSm*leuA*, Fig. R.12). Sin embargo no podemos descartar tal efecto polar de la mutación en GR410 sobre posibles genes implicados en el transporte de  $\alpha$ -IPM.

**TABLA R.1. Actividad  $\alpha$ -IPM sintasa en cepas de *S. meliloti* \***

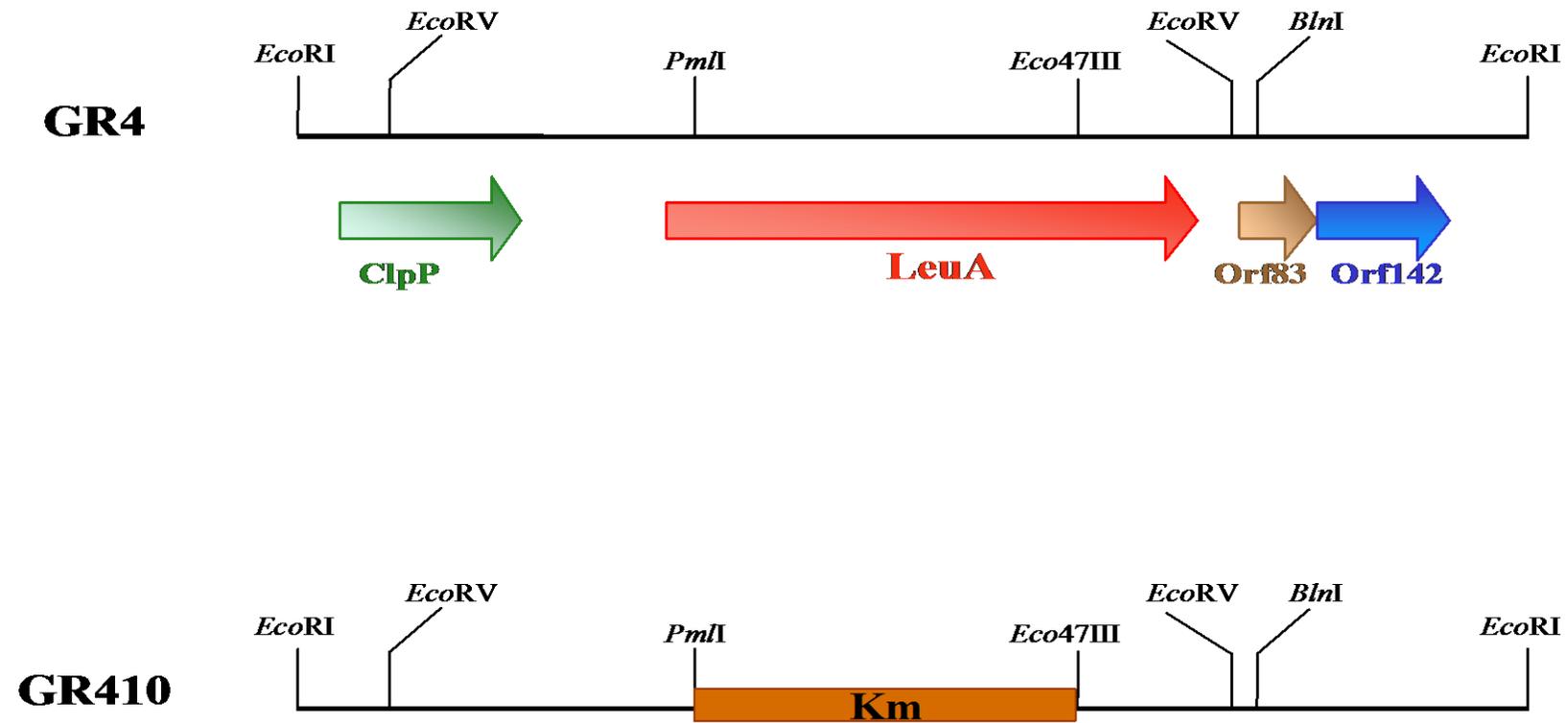
Cepa		1000 x Actividad específica ( U / mg proteína) <sup>b</sup>
<b>GR4 (silvestre)</b>	0.150	7.46 ± 0.22
<b>GR401</b>	0.150	0.116 ± 0.03
<b>GR402</b>	0.150	0.124 ± 0.08
GR410 ( <i>ΔleuA</i> )	0.150	0.112 ± 0.14
GR410(pSm <i>leuA</i> )	0.150	24.22 ± 0.26

\* La actividad enzimática fue determinada en extractos libres de células crecidas en MM con 0.4 g/L de glutamato sódico y leucina 200  $\mu$ M.

<sup>a</sup> Se indica la cantidad de proteína utilizada en cada reacción.

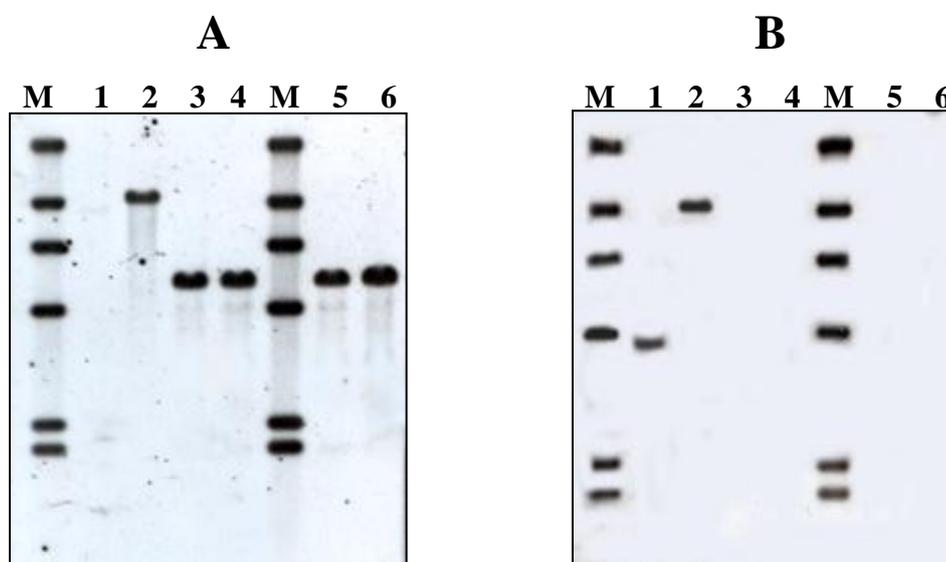
<sup>b</sup> U: 1 unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1  $\mu$ mol de CoA por minuto.

## Resultados



**FIGURA R.10.** Deleción del gen *leuA* de *S. meliloti* GR4. En la cepa GR410, el fragmento *PmlI*-*Eco47III* interno a *leuA* fue reemplazado por un gen de resistencia a Km.





**FIGURA R.11. Verificación de la deleción del gen *leuA* en la cepa GR410.**

**A:** Hibridación de ADNs genómicos digeridos con *Eco*RI frente al gen de resistencia a Km. **B:** Hibridación frente al fragmento *leuA* delecionado. 1) Cepa silvestre GR4; 2) Cepa auxotrofa GR401; 3-6) Distintas colonias tipo GR410; M)  $\lambda$ -*Hind*III.



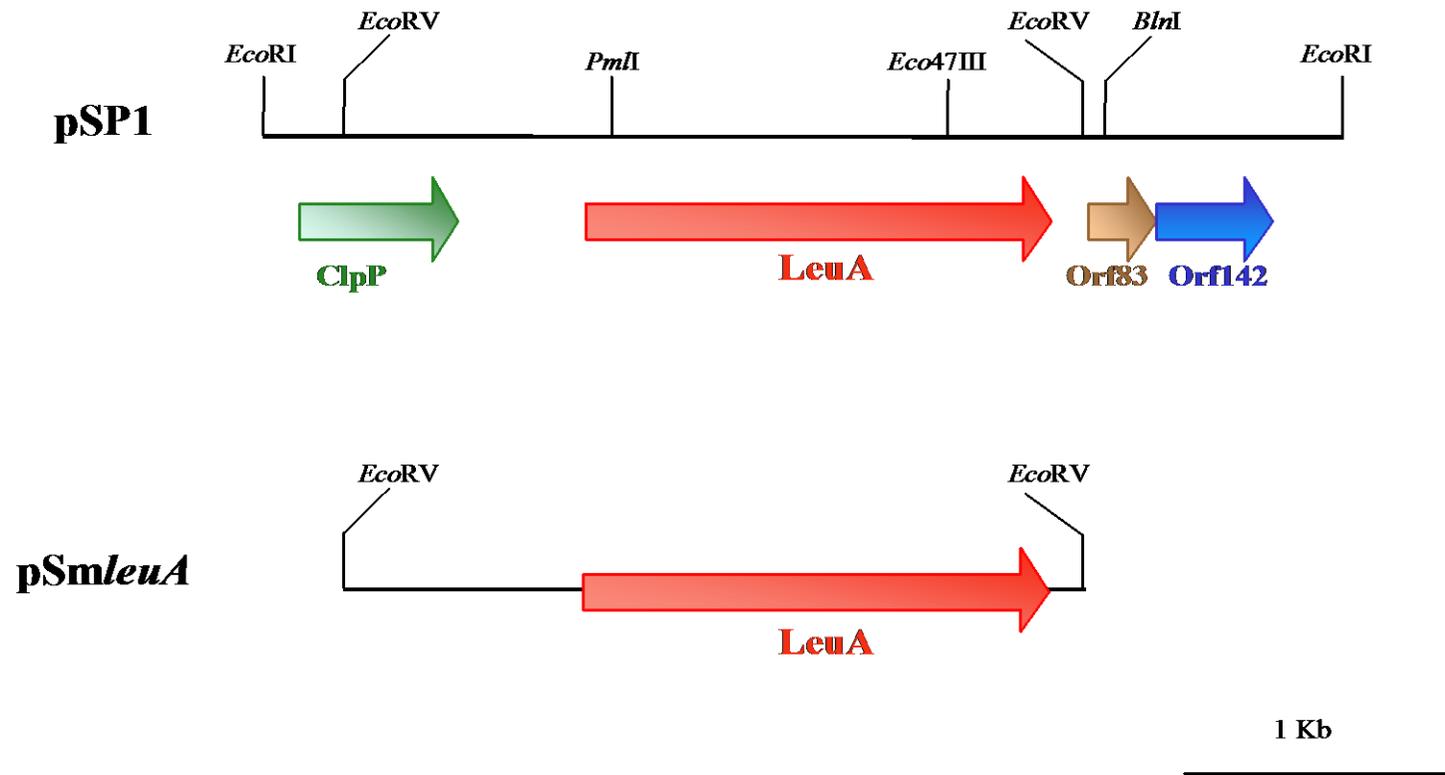


FIGURA R.12. Esquema del fragmento *leuA* clonado en pSmleuA. El fragmento *EcoRV* indicado fue clonado en el vector pJB3Tc19 Sm/Spc.

## Resultados

---

Otra posibilidad para explicar la falta de crecimiento de la cepa GR410 en medios suplementados con  $\square$ -IPM es que las células de *S. meliloti* no sean permeables a este compuesto. Este parece ser también el caso de *S. cerevisiae* y *Neurospora crassa* (Reichenbecher *et al.*, 1978), y posiblemente también el de *E. coli*. De hecho la cepa de *E. coli* CV512, descrita como  $LeuA^-$ , tampoco fue capaz de recuperar el crecimiento en medios suplementados con  $\square$ -IPM, aunque si mostró crecimiento en presencia de  $\square$ -KIC. Del mismo modo, cuando se introdujo en esta cepa CV512 el plásmido pSm $leuA$ , que contiene el gen  $leuA$  de *S. meliloti* clonado en el vector pJB3Tc19 (Fig. R.12), se complementó la auxotrofia de esta cepa, permitiendo su crecimiento en medio carente de leucina o de  $\square$ -KIC. Para explorar la posible impermeabilidad de las membranas de *S. meliloti* GR4 al  $\square$ -IPM, se intentó recuperar el crecimiento de la cepa GR410 en MM suplementado con distintas concentraciones de  $\square$ -IPM (entre 200 $\mu$ M y 10mM) y cantidades no inhibitorias de varios detergentes, tales como Tween 20 (0.1%), SDS (0.01%) o bromuro de alquil-trimetilamonio (MTAB, 0.005%). Sin embargo, no se consiguió el crecimiento de la cepa GR410 bajo ninguna de estas condiciones. Tampoco se han conseguido aislar mutantes derivados de la cepa GR410 capaces de crecer en MM suplementado con  $\square$ -IPM.

#### 4. COMPORTAMIENTO SIMBIÓTICO DE CEPAS AUXOTROFAS PARA LEUCINA CON UN GEN *LEUA* DELECCIONADO

Se comparó el comportamiento simbiótico de la cepa GR410 con el de la cepa silvestre GR4. Como se muestra en la figura R.13, GR410 fue incapaz de formar nódulos en alfalfa, lo que demostraba de forma clara que el gen  $leuA$  es necesario para la nodulación de esta leguminosa. El hecho de que el mutante GR402 ( $leuA::Tn5$ ) sea capaz de formar nódulos no fijadores, si bien con mucha menor eficiencia que la cepa silvestre (Fig. R.4), puede explicarse por la localización de la inserción del transposón en dicha cepa. Como se muestra en la Fig. R.3, el Tn5 se encuentra en esta cepa localizado hacia el extremo 3' de  $leuA$ , lo que permitiría la expresión de una proteína de 466 aa, que todavía contiene los dominos catalíticos esenciales y que podría, por tanto, mantener cierta actividad  $\square$ -IPM sintasa residual. Aunque esta hipotética actividad residual no fue detectable bajo nuestras condiciones experimentales (veáse la Tabla R.1), es necesario

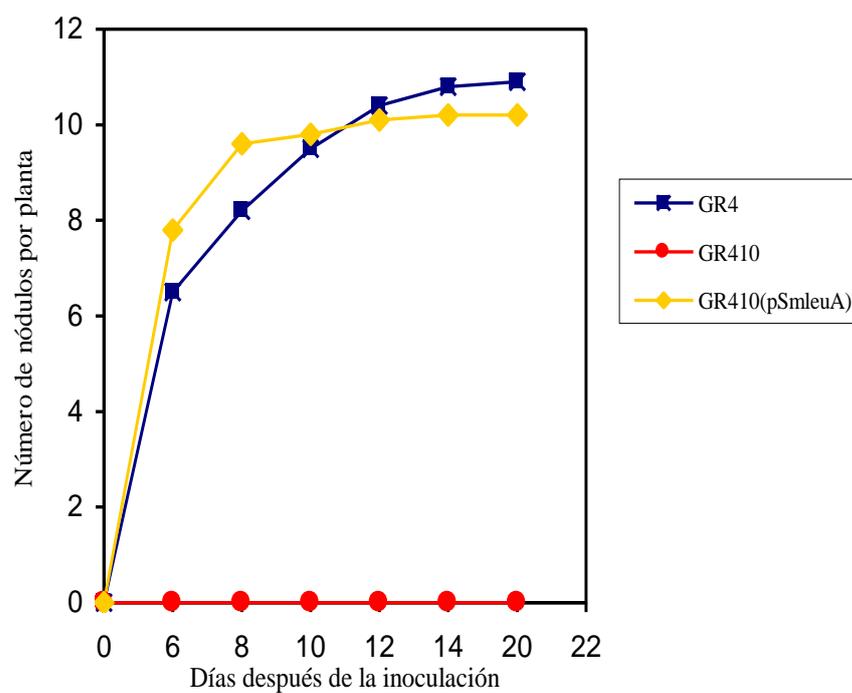
comentar que esta cepa GR402 mostró cierto nivel de crecimiento en placas de MM carente de leucina o  $\square$ -KIC cuando la incubación se prolongaba por espacio de 10-15 días. Este crecimiento tan retardado se observó en picadura, con niveles celulares iniciales inferiores a  $10^6$ , lo que en principio descarta que dicho crecimiento se debiese a reversión de la mutación.

Estos resultados mostraban que, a diferencia de lo descrito anteriormente por otros autores (Truchet *et al.*, 1980), las cepas *leuA* de *S. meliloti* son incapaces de formar nódulos en su planta hospedadora, alfalfa. Aunque los mutantes descritos por Truchet y colaboradores (1980) no fueron caracterizados genéticamente, tales auxotrofos eran derivados de la cepa L5-30 de *S. meliloti*. Para descartar que el fenotipo simbiótico mostrado por los mutantes *leuA* de la cepa GR4 pudiese ser debido a diferencias entre las cepas GR4 y L5-30, se construyó un mutante  $\Delta leuA$  derivado de *S. meliloti* 1021, que portaba una delección de *leuA* idéntica a la descrita para la cepa GR410. La idoneidad de la mutación fue comprobada mediante las correspondientes hibridaciones (datos no presentados). Este mutante, 1021-01, era auxotrofo para leucina y fue incapaz de nodular raíces de alfalfa bajo nuestras condiciones experimentales, al igual que la cepa GR410.

Cuando se introdujo el plásmido pSm*leuA* en la cepa GR410, se revertieron todos los fenotipos asociados a la mutación en *leuA*. La cepa GR410(pSm*leuA*) mostró crecimiento prototrófico, recuperó la actividad  $\square$ -IPM sintasa (Tabla R.1) y manifestó una capacidad de nodulación en alfalfa similar a la de la cepa silvestre (Fig. R.13). La actividad  $\square$ -IPM sintasa en esta cepa GR410(pSm*leuA*) fue 3 veces superior a la determinada en la cepa silvestre, posiblemente debido a un efecto de la dosis génica (Tabla R.1). Estos resultados demostraban que todos los fenotipos observados en relación a mutaciones en el gen *leuA* eran debidos exclusivamente a la alteración de dicho gen.

## 5. COMPORTAMIENTO SIMBIÓTICO DE CEPAS LEUA<sup>-</sup> EN MEDIOS SUPLEMENTADOS CON LEUCINA O SUS PRECURSORES.

Truchet y colaboradores (1980) describieron que cepas Leu<sup>-</sup> de *S. meliloti* L5-30 recuperaban la capacidad de formar nódulos fijadores en alfalfa cuando se suplementaba la



**FIGURA R.13. Cinética de nodulación de cepas  $\Delta leuA$ .** Se muestra la formación de nódulos en plantas de alfalfa inoculadas con la cepa silvestre GR4, el mutante GR410, y con un derivado de éste portador del plásmido pSmleuA.



solución nutritiva de la planta con leucina o con alguno de sus precursores,  $\square$ -KIC o  $\square$ -KIV, a pesar de que éste último compuesto no era capaz de aliviar la auxotrofia de dichos mutantes. Para explicar esta aparente paradoja, estos autores sugerían, de forma poco convincente, que el  $\square$ -KIV exógeno podría inducir en la planta la excreción de mayores cantidades de leucina, aliviando así la auxotrofia de los mutantes  $Leu^-$ . Por ello, y a pesar de las diferencias encontradas, se determinó el comportamiento simbiótico de la cepa GR410 en medios suplementados con leucina o sus precursores.

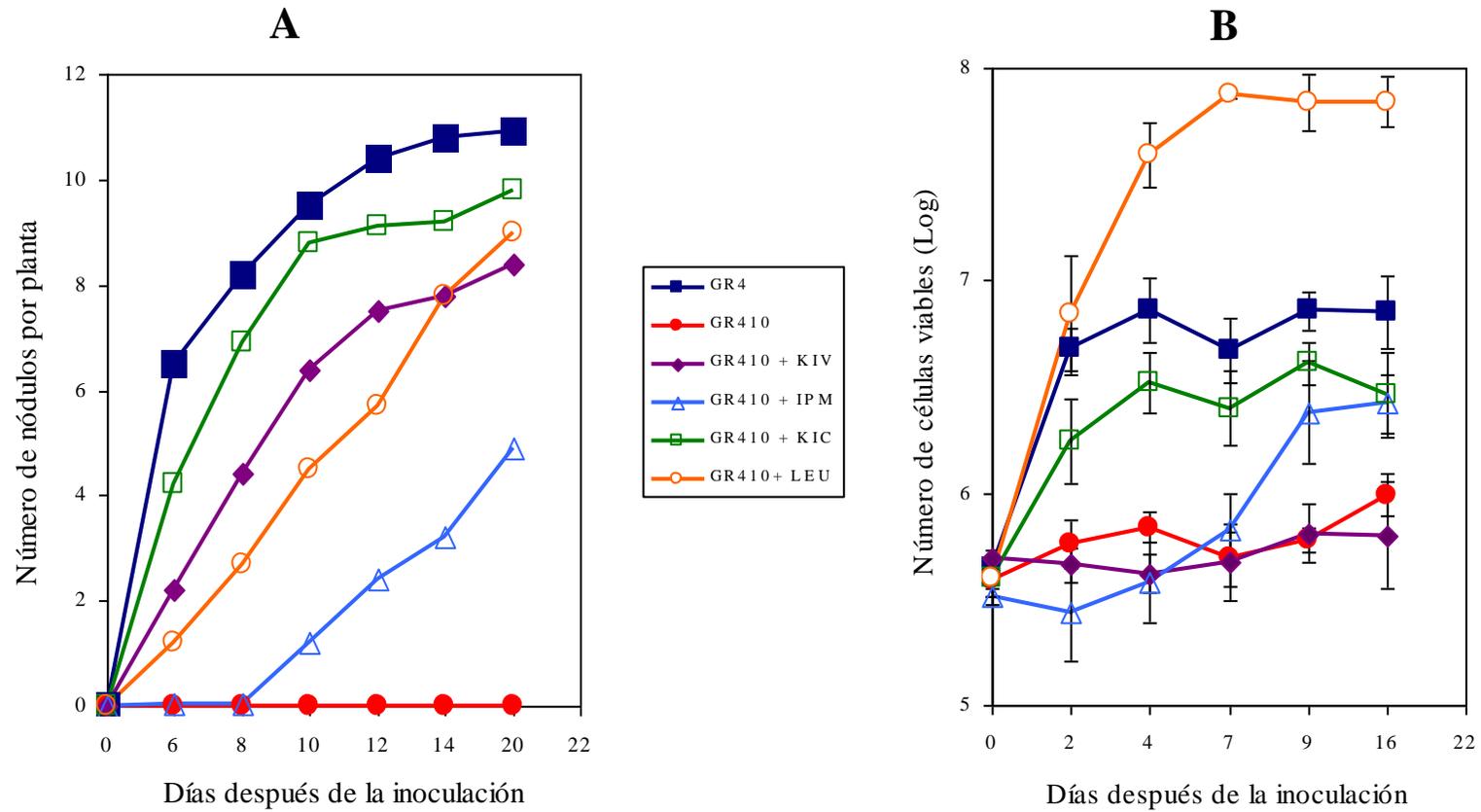
Simultáneamente a la inoculación de las plantas con las bacterias, se adicionaron leucina o sus precursores a la solución nutritiva vegetal, a una concentración final de 200  $\mu$ M. Como control se usaron plantas inoculadas con la cepa silvestre o con la cepa mutante GR410, a cuyo medio nutritivo se adicionó el volumen correspondiente de agua desionizada estéril. Como se observa en la Fig. R.14A, en presencia de leucina o de  $\square$ -KIC exógenos, la cepa GR410 recuperó la capacidad de nodulación. Los nódulos formados en ambos casos fueron similares a los de la cepa silvestre, de color rosado y aparentemente fijadores de nitrógeno. Aunque en presencia de  $\square$ -KIC la cepa *leuA* mostró una cinética de nodulación comparable a la de la cepa silvestre, todavía mostró un retraso considerable en el caso de la adición de leucina (Fig. R.14A). La cepa GR410 también recuperó la capacidad de nodulación en presencia de  $\square$ -IPM o  $\square$ -KIV exógenos, a pesar de que ninguno de estos compuestos era capaz de aliviar la auxotrofia de este mutante. En ambos casos la nodulación fue bastante retrasada respecto a la cepa silvestre, particularmente en el caso de  $\square$ -IPM (Fig. R.14A), y se formaron mezclas de nódulos blancos y rosados, incluso sobre una misma planta.

Para intentar comprender mejor esta restauración de la nodulación por dos compuestos que no son metabolizados por mutantes  $LeuA^-$ , se llevaron a cabo dos tipos de experimentos. Por un lado se determinó el nivel de leucina excretada por las raíces de alfalfa crecidas en presencia o ausencia de precursores de leucina. Por otra parte, se determinó la capacidad de crecimiento del mutante GR410 a expensas de los exudados radicales de alfalfa.

La cuantificación de aa excretados por la raíces de alfalfa, presentes en la solución nutritiva de las plantas, fue llevada a cabo con la ayuda de Luis Aparicio y la Dra. Isabel López-Calderón (Universidad de Sevilla). No se detectaron cantidades apreciables de leucina en ningún caso, salvo cuando este compuesto fue añadido a la solución mineral, si

bien se detectaron cantidades traza de otros aa como alanina. Tampoco se apreciaron cambios significativos en la composición de aa en los exudados radicales de alfalfa a cuya solución nutritiva se habían adicionado precursores de leucina, salvo en el caso de la adición de  $\square$ -KIC, en que se observó un incremento muy significativo de los niveles de asparagina y alanina acumulados en la solución mineral de las plantas (datos no presentados).

En experimentos paralelos a los de nodulación, se determinó el crecimiento bacteriano en la solución mineral de alfalfa suplementada o no con leucina o alguno de sus precursores. Para ello se tomaron alícuotas de la solución mineral de las plantas inoculadas y se sembraron las diluciones adecuadas en MM suplementado con leucina y los correspondientes antibióticos, contabilizando el número de células viables presentes en cada momento en la solución nutritiva de las plantas. Los recuentos se hicieron a partir de al menos 5 plantas individuales (1 planta/tubo). Como se muestra en la figura R.14B, en condiciones control (no adición de leucina ni de sus precursores) la cepa silvestre GR4 mostró un incremento muy rápido y significativo de la densidad celular en la solución nutritiva de plantas de alfalfa. Este crecimiento se estabilizó al cabo de 4 días tras la inoculación, posiblemente por agotamiento de algún compuesto exudado por la raíz. Por el contrario, en las mismas condiciones, el mutante GR410 no mostró crecimiento significativo (Fig. R.14B), lo que indirectamente evidenciaba que las raíces de alfalfa no excretan suficiente leucina para permitir el crecimiento de mutantes  $Leu^-$ . La adición de leucina a la solución mineral de la planta permitió un rápido crecimiento del mutante GR410, cuyo número se multiplicó por 100 en pocos días (Fig. R.14B). A pesar de este crecimiento muy superior al de la cepa silvestre bajo condiciones control, el mutante GR410 todavía mostraba bastante menor eficiencia de nodulación (Fig. R.14A). En presencia de  $\square$ -KIC, el mutante GR410 mostró cinéticas de crecimiento y de nodulación muy similares a las de la cepa silvestre (Fig. R.14 A y B). Cuando se añadió  $\square$ -IPM a la solución mineral vegetal, no se detectó crecimiento del mutante GR410 hasta 9 días después de la inoculación, momento en que empezaron a aparecer los primeros nódulos inducidos por esta cepa (Fig. R.14). Puesto que el mutante GR410 no puede utilizar  $\square$ -IPM, y dado que las plantas de alfalfa no parecen excretar una mayor cantidad de leucina



**FIGURA R.14. A: Cinética de nodulación; B: Crecimiento bacteriano en la solución nutritiva de alfalfa de las cepas GR4 y GR410 en presencia o ausencia de leucina (LEU) o sus precursores ( $\alpha$ -KIV,  $\alpha$ -IPM,  $\alpha$ -KIC) añadidos a la solución nutritiva de la planta a una concentración de 200  $\mu$ M.**



en estas condiciones, el crecimiento del mutante y la nodulación simultánea podrían deberse a la excreción, inducida por la presencia de  $\square$ -IPM en el medio, de algún otro compuesto por parte de las raíces vegetales (p.e. un precursor de la leucina como  $\square$ -KIC). Por último, cuando se adicionó  $\square$ -KIV al medio no se pudo detectar crecimiento del mutante GR410 en la solución mineral vegetal (Fig. R.14B). Sin embargo, bajo estas mismas condiciones, GR410 mostró cinéticas de nodulación similares a las alcanzadas en presencia de leucina (Fig. R.14A).

Los resultados obtenidos en estos tres tipos de experimentos pueden resumirse en los siguientes tres puntos:

- 1) En las condiciones experimentales utilizadas, las raíces de alfalfa no parecen excretar suficiente leucina para permitir el crecimiento de cepas *leuA* a expensas de los exudados radicales.
- 2) La adición de precursores de leucina al medio nutritivo de las plantas no conlleva una mayor excreción de leucina por la raíz, si bien se evidenciaron cambios cualitativos y cuantitativos en los exudados radicales inducidos por el  $\square$ -IPM y el  $\square$ -KIC exógenos.
- 3) La recuperación de la capacidad de nodulación por las cepas *leuA*, inducida por la presencia de leucina o sus intermediarios metabólicos en el medio, no está directamente relacionada con la recuperación del crecimiento a expensas de los exudados de alfalfa. Por ejemplo, mientras que la adición de leucina provocó un crecimiento exagerado de la densidad bacteriana dentro de la solución nutritiva vegetal, la adición de  $\square$ -KIV no conllevó cambios significativos en el número de células. En ambos casos, sin embargo, el mutante GR410 recuperó el fenotipo Nod<sup>+</sup>, mostrando cinéticas de nodulación parecidas.

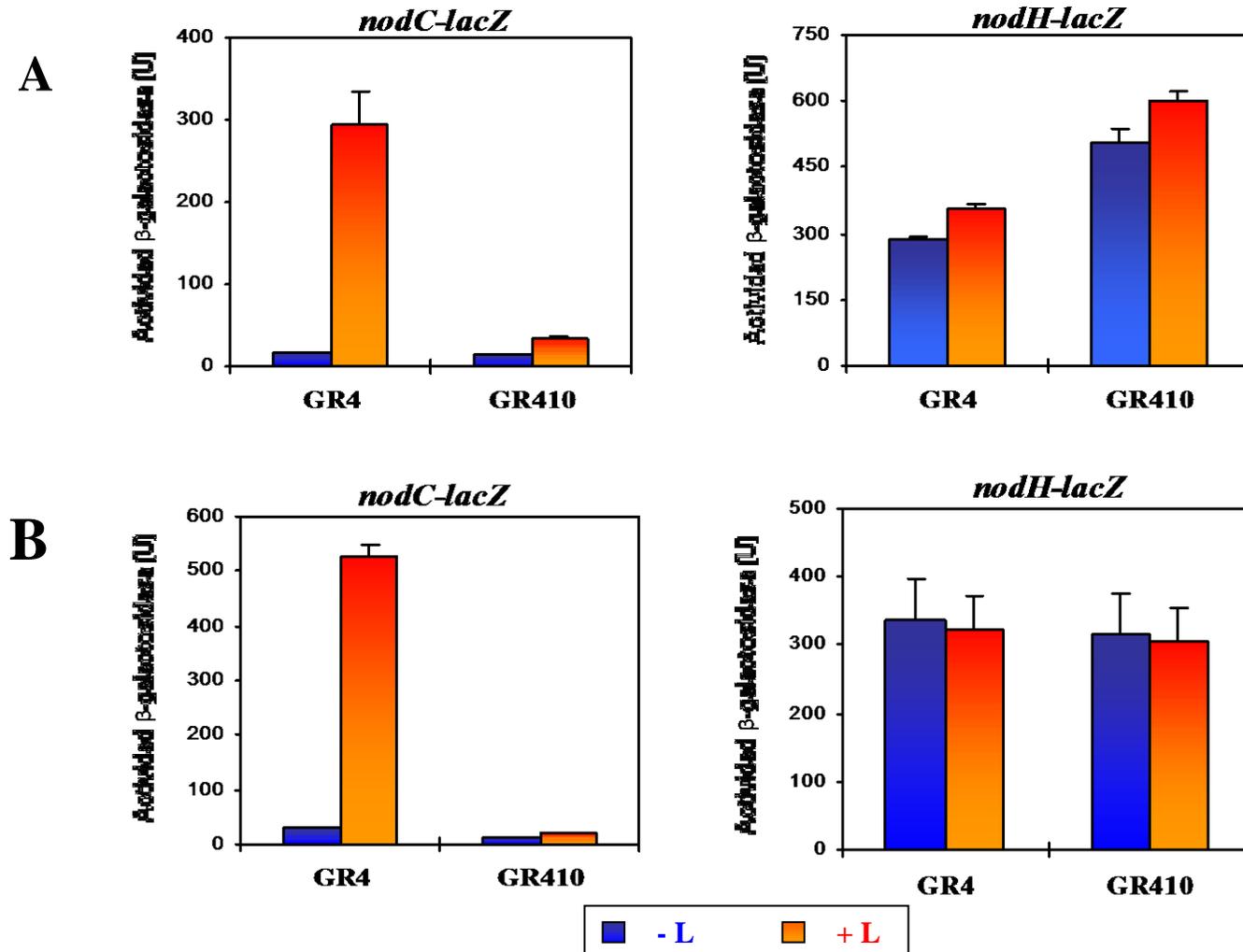
En otras palabras, estos resultados sugerían la posibilidad de que el fenotipo simbiótico asociado a mutaciones en el gen *leuA* no se debiese exclusivamente a la auxotrofia resultante, y que las mutaciones pudieran estar afectando también a otros procesos importantes para la nodulación.

### 6. EXPRESION DE LOS GENES DE NODULACION EN CEPAS LEUA DE *S. MELILOTI*

Puesto que los mutantes *leuA* de *S. meliloti* no son capaces de inducir la formación de nódulos en alfalfa, cabía la posibilidad de que la expresión de los genes de la nodulación estuviese alterada en estos mutantes. Para determinar si las cepas *leuA* son capaces de inducir correctamente los genes de la nodulación, se comparó la expresión de fusiones de genes *nod* al gen informador *lacZ*, en la cepa GR410 y la cepa silvestre GR4. Las bacterias fueron cultivadas en MM suplementado con cantidades variables de leucina o  $\square$ -KIC y en medio rico TY, para permitir el crecimiento normal del mutante GR410. Se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa en presencia o ausencia de luteolina, el principal inductor de los genes *nod* en *S. meliloti*. En la figura R.15 se muestran los resultados obtenidos para una fusión *nodC-lacZ* y una fusión *nodH-lacZ*. Esta última presenta la particularidad de que se expresa de manera independiente a la luteolina, debido a la presencia de *nodD3* y *syrM* en el plásmido portador de la fusión. Es conocido que cuando estos dos genes están en múltiples copias, NodD3 es capaz de activar la expresión de genes *nod* en ausencia de flavonoides inductores (Maillet *et al.*, 1990; Honma *et al.*, 1990; Kondorosi *et al.*, 1991; Swanson *et al.*, 1993).

La expresión de la fusión *nodC-lacZ* en la cepa silvestre fue dependiente de luteolina, que indujo dicha expresión alrededor de 15 veces, tanto en MM como en medio TY (Fig. R.15). Por el contrario, esta fusión sólo fue inducida 2 ó 3 veces por luteolina en el mutante GR410, tanto en medio MM adicionado de leucina o  $\square$ -KIC, como en medio TY (Fig. R.15). Esta incapacidad del mutante *leuA* para inducir la expresión de *nodC* a niveles similares a la cepa silvestre en respuesta a la luteolina, se observó también en presencia de diferentes concentraciones (entre 200  $\mu$ M y 5mM) de leucina o  $\square$ -KIC (datos no presentados).

La expresión de la fusión *nodH-lacZ*, como era de esperar, fue independiente de luteolina. A diferencia de la fusión *nodC-lacZ*, la fusión *nodH-lacZ* se expresó a altos niveles tanto en la cepa silvestre como en el mutante GR410 en todos los medios empleados (Fig. R.15).



**FIGURA R.15.** Expresión de fusiones de *nodC* y *nodH* a *lacZ* en la cepa silvestre de *S. meliloti* GR4 y en la cepa *leuA* GR410. La actividad β-galactosidasa (Unidades Miller) fue determinada en MM + leucina 200μM (A) y en medio TY (B), en ausencia (-L) ó presencia (+L) de luteolina 5 μM. Se obtuvieron resultados similares en MM suplementado con distintas cantidades de leucina o α-KIC. Los datos son la media de 3 experimentos. Las barras muestran la desviación estandar.



Por otro lado, se ensayó la expresión de los genes reguladores *nodD1* y *nodD3* de *S. meliloti*, utilizando las correspondientes fusiones a *lacZ* (plásmidos pRmM61 y pGMI149-*lacZV40*, respectivamente). En MM con leucina o  $\alpha$ -KIC, la fusión *nodD1-lacZ* se expresó en el mutante GR410 un 50% menos que en la cepa silvestre, si bien dicha expresión fue casi idéntica en ambas cepas cuando las células fueron crecidas en medio TY (Fig. R.16).

Por su parte, la expresión de *nodD3* resultó ser ligeramente inducible por luteolina, tanto en el mutante como en la cepa silvestre crecidos en MM suplementado con leucina o  $\alpha$ -KIC. En cambio, en medio TY la inducibilidad por luteolina fue menor, y en el caso del mutante GR410, prácticamente indetectable (Fig. R.16).

La expresión de genes *nod* no fue determinada en medios suplementados con  $\alpha$ -IPM o  $\alpha$ -KIV pues, como se ha visto anteriormente, estos compuestos no son metabolizados por mutantes *LeuA*<sup>-</sup> ni permiten su crecimiento. La inducción de la fusión *nodC-lacZ* sí fue determinada en medios suplementados con  $\alpha$ -IPM y alguno de los dos compuestos que permiten el crecimiento de las cepas *LeuA*<sup>-</sup> (leucina o  $\alpha$ -KIC). En este caso los resultados similares a los obtenidos en medios que contenían leucina o  $\alpha$ -KIC solamente, esto es, se mantenía en el mutante GR410 la baja inducibilidad por luteolina de la fusión *nodC-lacZ* en respuesta a luteolina (datos no presentados).

Estos resultados indicaban que la expresión de los genes *nodD1* y *nodD3* no está significativamente alterada en las cepas *leuA* de *S. meliloti*, como tampoco parecía estarlo la actividad de la proteína NodD3, a tenor de los datos de expresión de la fusión *nodH-lacZ*, dependiente de NodD3 e independiente de luteolina. Por el contrario, la inducción de la fusión *nodC-lacZ*, dependiente de luteolina y NodD1, sí estaba alterada de manera significativa en la cepa *leuA* GR410. A pesar de esto, la cepa GR410 mostró cierta inducción por luteolina (10-15% de la cepa silvestre) de la expresión de *nodC* en medios que contenían leucina o  $\alpha$ -KIC, compuestos que deben estar presentes en el medio nutritivo para que estos auxotrofos puedan crecer normalmente. Debe remarcarse aquí que, como se ha visto anteriormente, en presencia de dichos compuestos, la cepa GR410 fue capaz de nodular raíces de alfalfa (Fig. R.14A). Esta recuperación de la capacidad de nodulación podría estar ligada a la ligera inducción de genes *nod* observada en presencia de leucina o  $\alpha$ -KIC.

En *S. meliloti*, la proteína NodD1 es la principal responsable de la activación de los genes de la nodulación en respuesta a la luteolina. Por tanto, los resultados sugerían la posibilidad de que la mutación en *leuA* tuviese efectos negativos sobre la activación de genes de la nodulación en respuesta a flavonoides mediada por NodD1, aún cuando la activación por NodD3 no parecía estar afectada.

### **7.- EXPRESIÓN DE GENES *NOD* EN CEPAS SUPERPRODUCTORAS DE PROTEÍNAS NODD.**

Como se ha descrito anteriormente, los resultados apuntaban la posibilidad de que, además de una auxotrofia para leucina, las mutaciones en *leuA* tuviesen un efecto negativo sobre la activación de genes *nod* por flavonoides. En ausencia de leucina o sus precursores, las cepas *leuA* de *S. meliloti* son incapaces de formar nódulos en su planta hospedadora, alfalfa. En cambio, en presencia de leucina exógena o de sus precursores, estos mutantes son capaces de nodular, y muestran una débil, pero cuantificable inducción de genes *nod*. Por tanto, se hacía necesario determinar la inducción de genes *nod* en cepas *leuA* cultivadas en medios carentes de leucina o sus precursores.

Con objeto de determinar la activación de genes *nod* por NodD1 y NodD3 en ausencia de leucina o precursores de leucina, se llevaron a cabo una serie de experimentos utilizando cepas que sobreproducen bien la proteína NodD1, o bien NodD3. Es necesario recalcar de nuevo que los mutantes *LeuA*<sup>-</sup> no pueden crecer en medios carentes de leucina o  $\square$ -KIC y que, por tanto, si alguno de estos dos compuestos no está presente en el medio de cultivo, la única otra situación en que las cepas silvestre y mutante pueden ser fisiológicamente comparables es en medios carentes de una fuente de nitrógeno combinado. En este tipo de medio se llevó a cabo el ensayo de expresión de una fusión a *lacZ* del promotor de *nodA* de *R. leguminosarum* (plásmido pMP154), en células de la cepa silvestre GR4 y de la mutante GR410, que sobreproducían las proteínas NodD1 o NodD3. Esta fusión sólo es inducida ligeramente (2-3 veces) por la cepa silvestre GR4 en presencia de luteolina. Sin embargo, como se verá más adelante, se expresa a niveles elevados cuando las células producen un exceso de proteínas NodD. El uso de la fusión

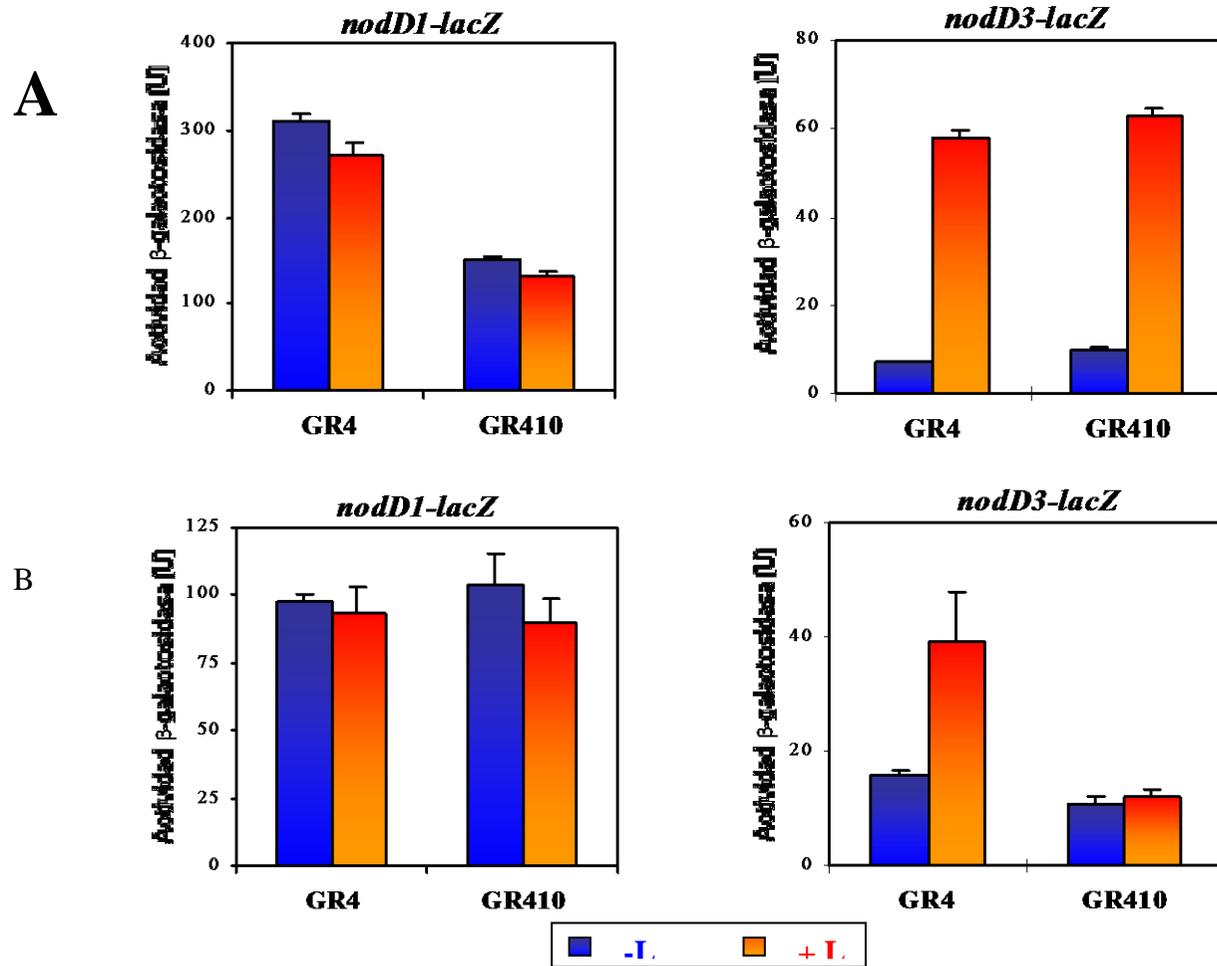


FIGURA R.16. Expresión de fusiones de *nodD1* y *nodD3* a *lacZ* en la cepa silvestre de *S. meliloti* GR4 y en la cepa *leuA* GR410. La actividad β-galactosidasa (Unidades Miller) fue determinada en MM + leucina 200μM (A) y en medio TY (B), en ausencia (-L) o presencia (+L) de luteolina 5μM. Los datos son la media de 3 experimentos. Las barras muestran la desviación estandar.



*nodA-lacZ* (clonada en un vector IncQ) vino impuesto por su compatibilidad con los plásmidos (de tipo IncP) desde los que se expresan *nodD1* o *nodD3* bajo el control del promotor *trp* (plásmidos pRmE43 y pRmE65). La actividad  $\beta$ -galactosidasa se midió en células incubadas durante 6 horas en medio sin fuente de nitrógeno combinado, al que se adicionó leucina o sus precursores, en presencia o ausencia de luteolina 1  $\mu$ M.

Como se observa en la figura R.17, la inducción de la fusión *nodA-lacZ* en células de la cepa silvestre que sobreproducen NodD1 fue estrictamente dependiente de la presencia de luteolina en el medio. Dicha inducción fue observada claramente y a niveles similares en todas las condiciones ensayadas. Los niveles de expresión fueron algo superiores en medio con leucina, posiblemente debido a que este compuesto alivia, al menos parcialmente, la limitación de nitrógeno impuesta. Por el contrario, la inducción no se observó en el caso de la cepa mutante GR410 a menos que en el medio estuvieran presentes la leucina o su precursor  $\alpha$ -KIC (Fig. R.17). En ausencia de estos compuestos, la cepa mutante, a diferencia de la cepa silvestre, no fue capaz de llevar a cabo la activación de la fusión *nodA-lacZ*. La activación no se observó en presencia de  $\alpha$ -IPM ni de  $\alpha$ -KIV. Como se ha visto anteriormente, las células de *S. meliloti* podrían no ser permeables al  $\alpha$ -IPM, mientras que el  $\alpha$ -KIV no puede ser metabolizado debido a la limitación de nitrógeno y al efecto de la mutación en *leuA*. Con leucina o  $\alpha$ -KIC los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa alcanzados por el mutante GR410 fueron similares a los de la cepa silvestre (Fig. R.17). Esto podría sugerir que la activación por NodD1 necesita de leucina o  $\alpha$ -KIC. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que cuando la cepa *leuA* producía una cantidad normal de proteína NodD1, ninguno de estos compuestos consiguió restaurar la activación de la fusión *nodC-lacZ* (véase la Fig. R.15) a los niveles de la cepa silvestre. Es posible que en ambas situaciones (Fig. R.15 y R.17) la proteína NodD1 sintetizada por la cepa *leuA* no sea completamente activa. Debe tenerse en cuenta que en el caso de la baja inducción de *nodC*, cuando las células producen una cantidad normal de proteína NodD1, los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa derivada de la fusión pudieran estar limitados por la actividad de NodD1 en el mutante. Por el contrario, en el segundo caso, en que existe un exceso de NodD1, la actividad  $\beta$ -galactosidasa en la cepa silvestre podría estar limitada por el número de copias de la fusión *nodA-lacZ*.

Por otra parte, la expresión de la fusión *nodA-lacZ* en células que sobreproducen la proteína NodD3 fue independiente de la existencia de luteolina en el medio de cultivo.

Además, se observaron niveles similares de expresión tanto en la cepa silvestre como en la cepa *LeuA*<sup>-</sup> y en todas las condiciones ensayadas (Fig. R.18).

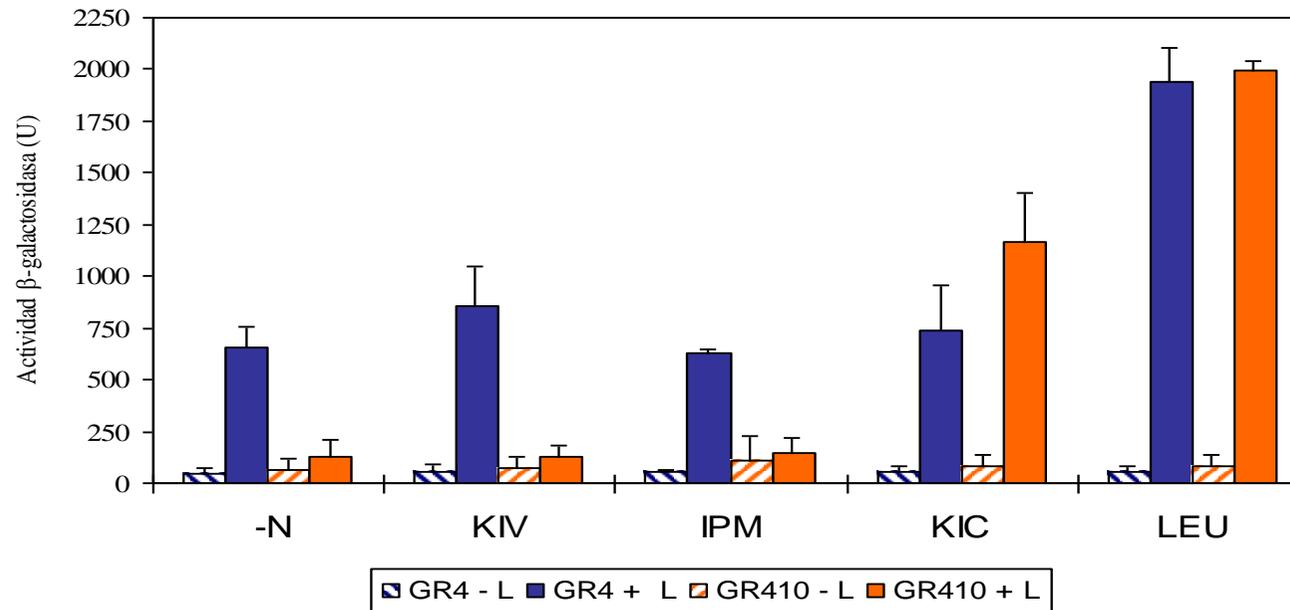
Estos resultados evidenciaban una vez más que la capacidad de NodD1 para activar genes *nod* en respuesta a la luteolina está alterada en cepas *LeuA*<sup>-</sup> de *S. meliloti*, mientras que la activación por NodD3, que no necesita de flavonoides, ocurre de manera similar a la cepa silvestre.

En vista de estos resultados, cabía la posibilidad de que una sobreproducción de NodD3 pudiera restaurar la capacidad de nodulación de cepas *leuA* de *S. meliloti*. Distintos autores han demostrado que dobles mutantes *nodD1-nodD2* de *S. meliloti*, que son incapaces de activar los genes de la nodulación en respuesta a los flavonoides de la planta, todavía son capaces de nodular alfalfa, aunque con una eficiencia muy disminuida (Göttfert *et al.*, 1986; Honma y Ausubel, 1987; Honma *et al.*, 1990). Esto es debido a la existencia de *nodD3*. Sin embargo, ni la cepa GR410(pRmE43) ni GR410(pRmE65), que sobreproducen las proteínas NodD1 y NodD3, respectivamente, fueron capaces de formar nódulos en raíces de alfalfa.

En su conjunto, los resultados obtenidos evidenciaban que el fenotipo Nod<sup>-</sup> mostrado por mutantes *leuA* de *S. meliloti* se debe posiblemente a la combinación de dos efectos provocados por la mutación: la auxotrofia para leucina, que provoca una limitación nutritiva en la rizosfera de alfalfa y, por otra parte, una incapacidad para activar correctamente la expresión de los genes de nodulación en respuesta a las moléculas señal de tipo flavonoide excretadas por la planta hospedadora. A tenor de los resultados, las cepas *leuA* todavía podrían expresar los genes de la nodulación a través del circuito NodD3-SyrM, pues como se ha visto ni la expresión de *nodD3* ni la actividad de su producto parecen estar significativamente afectados en estos mutantes. Sin embargo las cepas *leuA* son incapaces de nodular, posiblemente debido a que las raíces de alfalfa no parecen excretar cantidades apreciables de leucina, o de algún intermediario metabólico que alivie la limitación nutritiva de estos mutantes.

## Resultados

Medio de cultivo	Actividad $\beta$ -galactosidasa*			
	GR4		GR410	
	- L	+ L	- L	+ L
MM - Nitrog.	49.29 $\pm$ 28	657.18 $\pm$ 96	60.86 $\pm$ 54	127.00 $\pm$ 84
MM + KIV	53.53 $\pm$ 37	853.55 $\pm$ 196	69.43 $\pm$ 58	128.23 $\pm$ 58
MM + IPM	54.26 $\pm$ 13	626.46 $\pm$ 20	113.68 $\pm$ 110	143.30 $\pm$ 72
MM + KIC	58.66 $\pm$ 24	733.43 $\pm$ 227	77.80 $\pm$ 57	1169.30 $\pm$ 235
MM + LEU	58.08 $\pm$ 24	1936.03 $\pm$ 166	81.23 $\pm$ 27	1996.30 $\pm$ 44



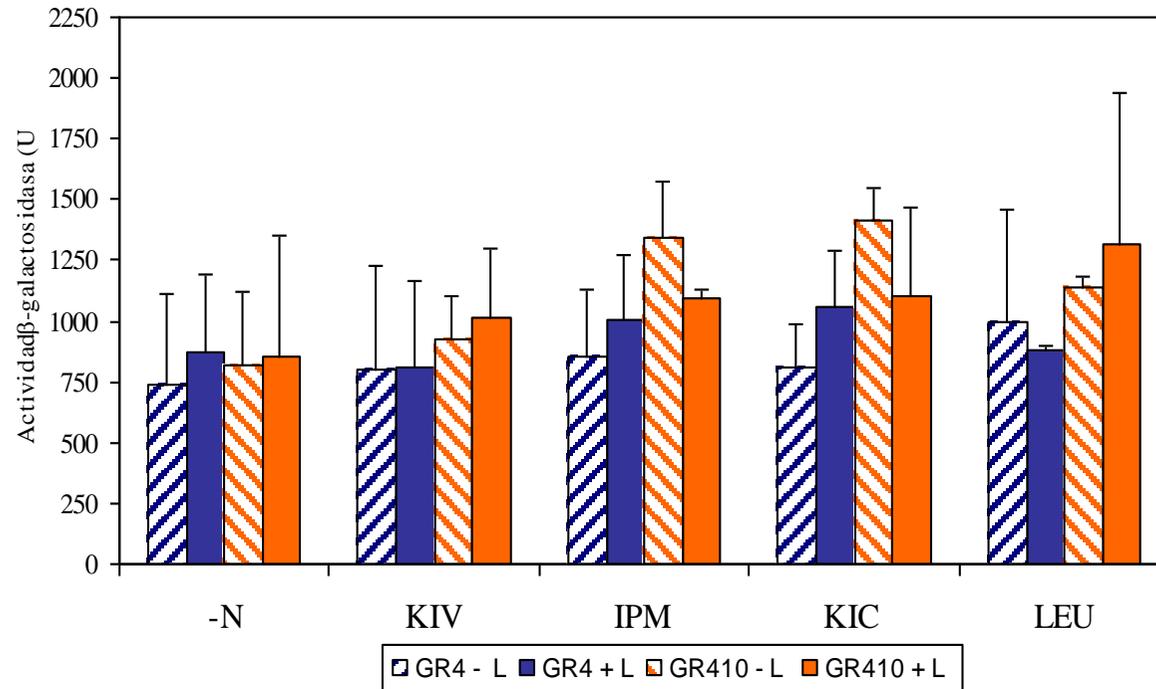
**FIGURA R.17.** Expresión de la fusión *nodA-lacZ* (pMP154) en cepas de *S. meliloti* que sobreproducen NodD1.\* Unidades Miller. -L, en ausencia de luteolina; +L, en presencia de luteolina 1  $\mu$ M. Los datos son media de 3 experimentos  $\pm$  Desviación estandar.

## Resultados

---

## Resultados

Medio de cultivo	Actividad $\beta$ -galactosidasa*			
	GR4		GR410	
	- L	+ L	- L	+ L
MM - Nitrog.	736.5 $\pm$ 378	868.10 $\pm$ 321	815.00 $\pm$ 310	854.05 $\pm$ 498
MM + KIV	799.01 $\pm$ 430	812.50 $\pm$ 350	925.51 $\pm$ 177	1011.03 $\pm$ 291
MM + IPM	852.50 $\pm$ 281	1009.04 $\pm$ 264	1338.50 $\pm$ 240	1093.10 $\pm$ 39
MM + KIC	806.11 $\pm$ 178	1062.51 $\pm$ 227	1413.06 $\pm$ 136	1102.08 $\pm$ 362
MM + LEU	993.52 $\pm$ 464	879.51 $\pm$ 18	1137.00 $\pm$ 45	1317.04 $\pm$ 618



**FIGURA R.18. Expresión de la fusión *nodA-lacZ* (pMP154) en cepas de *S. meliloti* que sobreproducen NodD3.\* Unidades Miller. -L, en ausencia de luteolina; +L, en presencia de luteolina 1  $\mu$ M. Los datos son media de 3 experimentos  $\pm$  Desviación estandar.**

## Resultados

---

## 8. CARACTERIZACIÓN DEL GEN *LEUC* DE *S. MELILOTI*

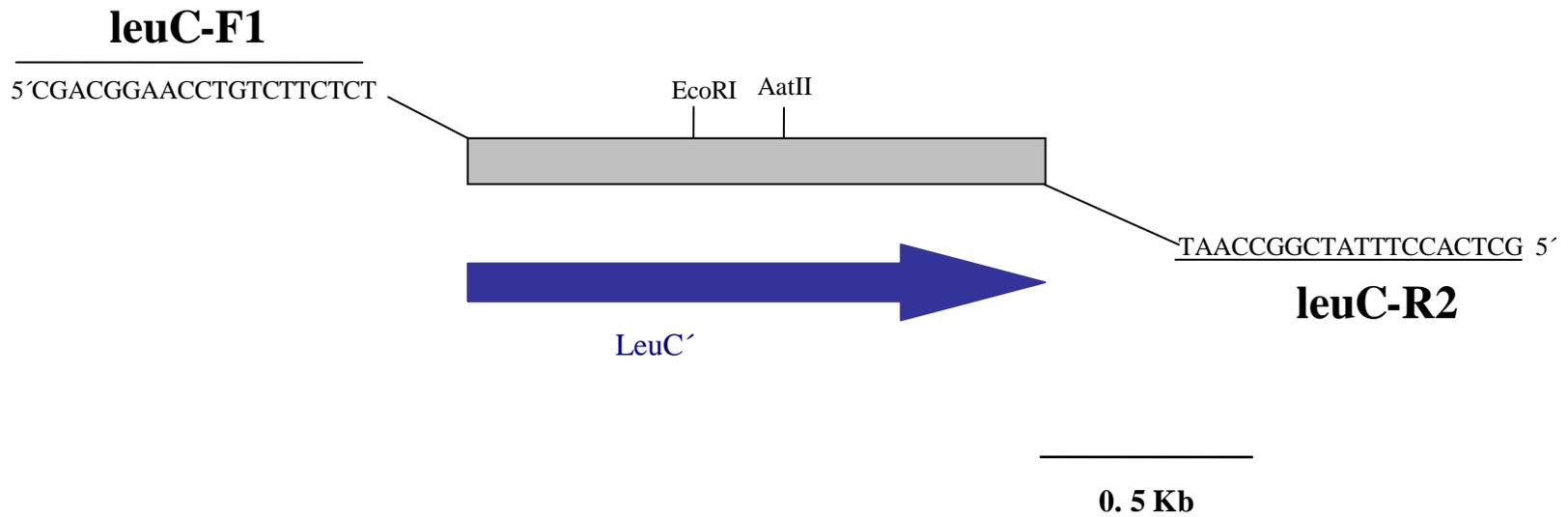
En vista de que la ausencia de actividad  $\alpha$ -IPM sintasa en *S. meliloti* conlleva la pérdida de la capacidad de nodulación asociada a una incapacidad para inducir correctamente los genes de la nodulación en respuesta a los flavonoides de la planta, se llevó a cabo la caracterización de otro gen *leu* de *S. meliloti* GR4. El objetivo era determinar si la ausencia de otras actividades enzimáticas de la ruta biosintética de leucina tenían también efectos negativos sobre la nodulación y, especialmente, sobre la inducción de genes *nod*.

Además de *leuA*, la biosíntesis de leucina en bacterias requiere de otros tres genes específicos: *leuCD* codifican para las dos subunidades de la  $\alpha$ -isopropilmalato isomerasa (isopropilmalato deshidratasa), que cataliza la conversión de  $\alpha$ -IPM en  $\beta$ -IPM, mientras que *leuB* codifica para una  $\beta$ -IPM deshidrogenasa, que cataliza el paso de  $\beta$ -IPM a  $\alpha$ -KIC. Este último compuesto es el precursor directo de la leucina, que en *E. coli* puede ser sustrato para dos aminotransferasas distintas. Se decidió caracterizar el gen *leuC* de *S. meliloti* GR4, que codifica para la subunidad mayor de la  $\alpha$ -IPM isomerasa. Para ello se hizo uso de la secuencia parcial (1X) del genoma de *S. meliloti* 1021, obtenida por la Dra. S. Long y colaboradores, en la Universidad de Stanford (Estados Unidos; <http://cmgm.stanford.edu/~mbarnett/1xgenome.htm>). Utilizando la secuencia de la proteína LeuC de *Azotobacter vinelandii*, se hizo una búsqueda, mediante el programa Blast, de secuencias que pudieran codificar para una putativa LeuC en *S. meliloti* 1021. Se identificaron dos clones, 423059F02.x1 y 423122G10.x1, que contenían la secuencia de nucleótidos del extremo (truncado) 5' y del extremo 3', respectivamente, del posible gen *leuC* de esta bacteria. A partir de dicha secuencia se sintetizaron dos oligonucleótidos, leuC-F1 (5'-CGACGGAACCTGTCTTCTCT-3') y leuC-R2 (5'-TAACCGGCTATTTCCACTCG-3'), que se utilizaron en una reacción de amplificación del ADN genómico de *S. meliloti* GR4 mediante PCR. Se obtuvo un único producto de amplificación, de 1355 pb (Fig. R.19). Dicho fragmento de ADN fue clonado en el vector PCR-TOPO 3.9 kb para facilitar su secuenciación en ambas cadenas. La secuencia de nucleótidos se muestra en la Fig. R.20, así como la secuencia de aa deducida de la misma. Este fragmento de ADN contiene un gen *leuC* casi completo, a falta del extremo 5', como era de esperar dado que uno de los cebadores de amplificación (leuC-F1)

se diseñó a partir de la secuencia interna a la zona codificante del gen. La secuencia de aminoácidos deducida para la proteína LeuC' muestra más del 60% de identidad con la secuencia de  $\square$ -IPM isomerasas de hongos y de diversas bacterias. Mientras que en procariontes la  $\square$ -IPM isomerasa es codificada por dos genes diferentes, *leuCD*, en hongos esta proteína consta de una única subunidad que corresponde a una fusión LeuCD. El alineamiento de la secuencia de LeuC' de *S. meliloti* con otras proteínas se muestra en la Fig. R.21. Además, en la secuencia deducida para LeuC' están presentes los dos motivos Aco-1 y Aco-2 conservados en aconitasas y  $\square$ -IPM isomerasas. El motivo Aco-1 corresponde a los residuos 321-327 de LeuC' de *S. meliloti* GR4, mientras que la secuencia Aco-2 se extiende entre los aa 381-384. Estos resultados evidenciaban de manera bastante fiable que el ADN amplificado y clonado correspondía a un gen *leuC*.

Posteriormente se construyó un mutante en este gen *leuC*, mediante la introducción de un gen de resistencia a Sm/Sp en el único sitio *AatII* existente en el fragmento clonado, tal y como se esquematiza en la Fig. R.22. La idoneidad de la mutación tras el intercambio alélico en el genoma de *S. meliloti* GR4 fue verificada mediante hibridación (Fig. R.23).

Sorprendentemente, la cepa *leuC* GR440 mostró crecimiento prototrófico. Además, fue capaz de formar nódulos de manera similar a la cepa silvestre en raíces de alfalfa (Fig. R.24) Estos resultados indican que en el genoma de *S. meliloti* GR4 existe una segunda copia de *leuC*, o bien existe otra proteína que puede sustituir a la proteína LeuC en su actividad enzimática. La hibridación del ADN genómico de GR4 con una sonda *leuC*, en condiciones de alta astringencia no mostró otras señales de hibridación más que aquellas correspondientes al gen *leuC* caracterizado (Fig. R.23). La búsqueda de secuencias homólogas en el servidor Blast de la secuencia completa del genoma de *S. meliloti* 1021 dio como resultado dos proteínas: una anotada como isopropilamalato deshidratasa y que extrañamente sólo muestra un 93% de identidad con la proteína LeuC de GR4. La otra proteína con cierto nivel de homología es la anotada como aconitasa. Aconitasas e IPM deshidratasas comparten dos motivos aminoácidos (Aco-1 y Aco-2) conservados en ambos tipos de proteínas. De hecho, la reacción enzimática que llevan a cabo es muy parecida. Por tanto, la mutación introducida en el gen *leuC* caracterizado no provocó la auxotrofia que era de esperar, y posiblemente como consecuencia de ello, la cepa LeuC' obtenida no mostró ninguna diferencia en su comportamiento simbiótico con respecto a la



**FIGURA R.19. Representación esquemática del fragmento de PCR que contiene un gen *leuC* de *S. meliloti* GR4. Se muestra la secuencia de los cebadores ( leuC-F1 y leuC-R2) utilizados en la reacción de amplificación.**

## Resultados

---

```

10          30          50          70          90
CGACGGAACTGTCTTCTCTACATCGACTGTACCTCGTTCACGAGGTGACGAGCCCGCAGGCCTTCGAGGGACTGCGCATGGCTGGGCG
D G T C L L Y I D C H L V H E V T S P Q A F E G L R M A G R

110          130          150          170
CAAGGTTTCGGCCCCGAAAAGACGCTCGCCGTCGTCGATCACAAACGTCCCGACTTCGCCGGACCCGCATCTCGGCATCAAGAACGAGGA
K V R A P E K T L A V V D H N V P T S P D R H L G I K N E E

190          210          230          250          270
AAGCCGCATCCAGGTCGAGGCGCTCGCCAGGAACGCCGCGGATCTCGGCGTCGAATATTATTTCGAAAATGACAAGCGCCAAGGGATCGT
S R I Q V E A L A R N A A D L G V E Y Y S E N D K R Q G I V

290          310          330          350
CCACATCGTCGGTCCGGAGCAGGGCTTCACGCTGCCGGGCATGACGATCGTCTGCCGGCAGCCACACTTCGACGCACGGCGCTTTTCGG
H I V G P E Q G F T L P G M T I V C G D S H T S T H G A F G

370          390          410          430          450
TGGCGTGGCGCACGGCATCGGCACGTCCGAGGTCGAGCATGTCCTGGCGACGCAGACGCTGATCCAGAAAAAGGCGAAGAACATGCTGGT
A L A H G I G T S E V E H V L A T Q T L I Q K K A K N M L V

470          490          510          530
GCGCGTCGACGGCCAATTGCCCGCGGGCGTCACCGCAAAGGACATCATCCTTTCGATCATCGGCGAGATCGGCACCCGCGGGCGGCACCCGG
R V D G Q L P P G V T A K D I I L A I I G E I G T A G G T G

550          570          590          610          630
CCACGTCATCGAATTGCCCGGTGAAGCGATCCGGTTCGCTGTCTATGGAAGGCCGATGACCGTCTGCAACATGACGATCGAAGGCGGGCGC
H V I E F A G E A I R S L S M E G R M T V C N M T I E G G A

650          670          690          710
GCGCGCCGGGCTGATCGCACCGGACGAAACCACTTTTCGAGTACATCAAGGACAAGCCCGCGCTCCCAAAGGCGAGGCGCTGGGACAGGGC
R A G L I A P D E T T F E Y I K D K P R A P K G E A W D R A

730          750          770          790          810
GGTCAATACTGGAAGACGCTGCACATGGACGAAGGCGCCCAATTACGACCGCGTCGTCGTGCTCGATGCCGCCAATCTGCCGCCGATCGT
V E Y W K T L H M D E G A H Y D R V V V L D A A N L P P I V

830          850          870          890
TTCCTGGGGCTCCTCGCCGGAAGACGTCGTCCTCCGTACAGGGCGTGGTTCCCAACCCTGACGACATCCAGGACGAGACGAAGCGGACCTC
S W G S S P E D V V S V Q G V V P N P D D I Q D E T K R T S

910          930          950          970          990
CAAGTGGCGTGGCTCGACTATATGGGCTGAAGCCCGGCACGAAGATCACCGATATCGCCATCGACCCGGGTGTTTCATCGGCTCCTGCAC
K W R A L D Y M G L K P G T K I T D I A I D R V F I G S C T

1010          1030          1050          1070
CAATGGCCGCATCGAGGACCTGCGCGCCGTCGCCGAGGTGGTTCGAAGGCCGCAAGGTCTCCCCGACCGTTTCGGCGATGATCGTTCCGGG
N G R I E D L R A V A E V V E G R K V S P T V S A M I V P G

1090          1110          1130          1150          1170
CTCCGGCTCGTCAAGGAACAGGCGGAAGCGGAAGCCCTGGACAAGATCTTCAAGGAAGCGGGCTTCGACTGGCGCGAGCCCGGCTGCTC
S G L V K E Q A E A E G L D K I F K E A G F D W R E P G C S

1190          1210          1230          1250
CATGTGCCTGGCGATGAACGACGACCCGGCTGAAGCCTGGCGAACGTTGTGCCTCCACATCGAACCCGCAACTTCGAAGGCCGTCAGGGCTT
M C L A M N D D R L K P G E R C A S T S N R N F E G R Q G F

1270          1290          1310          1330          1350
CAAGGGGCGCACGCATCTGCTTCTCCGCAATGGCGGCTGCGGGCGGGTCCGCCGTCATTTTCGACATTCGCGAGTGGAAATAGCC
K G R T H L L S P A M A A A A V A G H F V D I R E W K *

GGTTA

```

**FIGURA R.20. Secuencia de nt del fragmento de PCR que contiene *leuC'* de *S. meliloti*. Se muestra también la secuencia de aa deducida para la proteína correspondiente.**



## Resultados

RPID	1	.....MGR <b>T</b> LY <b>D</b> K <b>V</b> W <b>D</b> D <b>H</b> V <b>D</b> Q <b>Q</b> E <b>D</b> G <b>T</b> C <b>L</b> I <b>Y</b> I <b>D</b> R <b>H</b> L <b>V</b> H <b>E</b> V <b>T</b> S <b>P</b> Q <b>A</b> F <b>E</b> G <b>L</b> R <b>N</b> A <b>G</b> R <b>K</b> V <b>R</b> R <b>P</b> D <b>C</b> T <b>L</b> A <b>T</b> V <b>D</b> H <b>N</b> I <b>P</b> T <b>P</b> R <b>K</b> N <b>F</b> K <b>N</b> V <b>S</b> T <b>F</b> I <b>Q</b> E <b>A</b> D <b>S</b> R <b>T</b> Q <b>C</b> E <b>T</b> L <b>E</b> H
SPID	1	MS <b>P</b> S <b>V</b> AS <b>P</b> K <b>T</b> LY <b>D</b> K <b>V</b> W <b>D</b> S <b>H</b> V <b>D</b> L <b>Q</b> E <b>D</b> G <b>T</b> C <b>L</b> LY <b>I</b> D <b>R</b> H <b>L</b> I <b>H</b> E <b>V</b> T <b>S</b> P <b>Q</b> A <b>F</b> E <b>G</b> L <b>R</b> T <b>A</b> G <b>R</b> K <b>V</b> R <b>H</b> P <b>E</b> L <b>A</b> L <b>A</b> T <b>V</b> D <b>H</b> N <b>I</b> P <b>T</b> D <b>P</b> R <b>K</b> D <b>M</b> K <b>D</b> I <b>A</b> S <b>F</b> I <b>H</b> Q <b>P</b> D <b>S</b> R <b>T</b> Q <b>V</b> L <b>A</b> L <b>E</b> N
SMLEUC'	1	.....D <b>G</b> T <b>C</b> L <b>Y</b> I <b>D</b> C <b>H</b> L <b>V</b> H <b>E</b> V <b>T</b> S <b>P</b> Q <b>A</b> F <b>E</b> G <b>L</b> R <b>M</b> A <b>G</b> R <b>K</b> V <b>R</b> A <b>P</b> E <b>K</b> T <b>L</b> A <b>V</b> D <b>H</b> N <b>V</b> P <b>T</b> S <b>P</b> .....D <b>R</b> H <b>L</b> G <b>I</b> K <b>N</b> E <b>S</b> R <b>I</b> Q <b>V</b> E <b>A</b> L <b>A</b> R
UMID	1	.....M <b>A</b> P <b>K</b> T <b>L</b> Y <b>E</b> K <b>I</b> F <b>D</b> S <b>H</b> L <b>V</b> H <b>E</b> E <b>A</b> D <b>G</b> T <b>C</b> L <b>Y</b> I <b>D</b> R <b>H</b> L <b>V</b> H <b>E</b> V <b>T</b> S <b>P</b> Q <b>A</b> F <b>E</b> G <b>L</b> R <b>N</b> A <b>R</b> K <b>V</b> R <b>R</b> T <b>D</b> C <b>T</b> L <b>A</b> T <b>V</b> D <b>H</b> N <b>I</b> P <b>T</b> A <b>S</b> R <b>K</b> S <b>Y</b> R <b>D</b> T <b>K</b> S <b>F</b> V <b>E</b> Q <b>V</b> D <b>S</b> R <b>T</b> Q <b>C</b> M <b>T</b> L <b>E</b> E
ECLEUC	1	.....A <b>K</b> T <b>L</b> Y <b>E</b> K <b>L</b> F <b>D</b> A <b>H</b> V <b>V</b> Y <b>E</b> A <b>E</b> N <b>E</b> T <b>P</b> L <b>Y</b> I <b>D</b> R <b>H</b> L <b>V</b> H <b>E</b> V <b>T</b> S <b>P</b> Q <b>A</b> F <b>D</b> G <b>L</b> R <b>A</b> H <b>G</b> R <b>P</b> V <b>R</b> Q <b>P</b> G <b>K</b> T <b>F</b> A <b>T</b> M <b>D</b> H <b>N</b> V <b>S</b> T <b>Q</b> T.....K <b>D</b> I <b>N</b> A <b>C</b> G <b>E</b> M <b>A</b> .....R <b>I</b> Q <b>M</b> Q <b>E</b> L <b>I</b> K
AVLEUC	1	.....M <b>A</b> G <b>K</b> T <b>L</b> Y <b>D</b> K <b>L</b> W <b>D</b> M <b>H</b> E <b>V</b> K <b>R</b> R <b>D</b> D <b>G</b> S <b>S</b> L <b>I</b> Y <b>I</b> D <b>R</b> Q <b>I</b> L <b>H</b> E <b>V</b> T <b>S</b> P <b>Q</b> V <b>R</b> G <b>A</b> A <b>P</b> G <b>R</b> A <b>N</b> V <b>A</b> R <b>G</b> .....C <b>Q</b> H <b>R</b> H <b>P</b> G <b>P</b> Q <b>R</b> A <b>D</b> H <b>P</b> G <b>S</b> P <b>V</b> G <b>R</b> R <b>H</b> R <b>R</b> R <b>N</b> L <b>A</b> H <b>P</b> G <b>A</b> D
RPID	95	N <b>V</b> K <b>E</b> F <b>G</b> L <b>T</b> Y <b>F</b> G <b>.</b> M <b>D</b> S <b>R</b> Q <b>G</b> I <b>V</b> H <b>V</b> I <b>G</b> .. <b>P</b> E <b>Q</b> G <b>F</b> T <b>L</b> P <b>G</b> T <b>V</b> N <b>C</b> G <b>D</b> S <b>H</b> T <b>S</b> T <b>H</b> G <b>A</b> F <b>G</b> A <b>L</b> A <b>F</b> G <b>I</b> G <b>T</b> S <b>E</b> V <b>E</b> H <b>V</b> L <b>A</b> T <b>Q</b> T <b>L</b> L <b>Q</b> K <b>S</b> K <b>N</b> M <b>R</b> V <b>K</b> V <b>D</b> G <b>L</b> A <b>P</b> G <b>V</b> T <b>S</b> K <b>D</b> I <b>V</b> L
SPID	101	N <b>I</b> K <b>E</b> F <b>G</b> L <b>T</b> Y <b>Y</b> G <b>.</b> M <b>N</b> D <b>R</b> R <b>Q</b> G <b>I</b> V <b>H</b> V <b>I</b> G <b>..<b>P</b>E</b> Q <b>G</b> F <b>T</b> L <b>P</b> G <b>T</b> T <b>L</b> V <b>C</b> G <b>D</b> S <b>H</b> T <b>S</b> T <b>H</b> G <b>A</b> F <b>G</b> A <b>L</b> A <b>F</b> G <b>I</b> G <b>T</b> S <b>E</b> V <b>E</b> H <b>V</b> L <b>A</b> T <b>Q</b> T <b>L</b> L <b>Q</b> R <b>K</b> S <b>K</b> N <b>M</b> R <b>I</b> R <b>V</b> N <b>G</b> L <b>P</b> E <b>G</b> I <b>A</b> S <b>K</b> D <b>L</b> I <b>L</b>
SMLEUC'	71	N <b>A</b> A <b>D</b> L <b>G</b> V <b>E</b> Y <b>Y</b> S <b>.</b> E <b>N</b> D <b>K</b> R <b>Q</b> G <b>I</b> V <b>H</b> I <b>V</b> G <b>..<b>P</b>E</b> Q <b>G</b> F <b>T</b> L <b>P</b> G <b>M</b> T <b>I</b> V <b>C</b> G <b>D</b> S <b>H</b> T <b>S</b> T <b>H</b> G <b>A</b> F <b>G</b> A <b>L</b> A <b>H</b> G <b>I</b> G <b>T</b> S <b>E</b> V <b>E</b> H <b>V</b> L <b>A</b> T <b>Q</b> T <b>L</b> L <b>Q</b> K <b>A</b> K <b>N</b> M <b>L</b> V <b>R</b> V <b>D</b> G <b>Q</b> L <b>P</b> P <b>G</b> V <b>T</b> A <b>K</b> D <b>I</b> L
UMID	96	N <b>V</b> K <b>A</b> F <b>G</b> L <b>T</b> F <b>F</b> G <b>.</b> L <b>S</b> D <b>N</b> R <b>Q</b> G <b>I</b> V <b>H</b> I <b>I</b> G <b>..<b>P</b>E</b> Q <b>G</b> F <b>T</b> L <b>P</b> G <b>A</b> T <b>I</b> V <b>C</b> G <b>D</b> S <b>H</b> T <b>S</b> T <b>H</b> G <b>A</b> F <b>G</b> A <b>L</b> A <b>F</b> G <b>I</b> G <b>T</b> S <b>E</b> V <b>E</b> H <b>V</b> L <b>A</b> T <b>Q</b> T <b>L</b> L <b>Q</b> K <b>R</b> A <b>K</b> N <b>M</b> L <b>I</b> Q <b>V</b> D <b>G</b> E <b>L</b> S <b>Q</b> G <b>V</b> T <b>S</b> K <b>D</b> I <b>L</b>
ECLEUC	88	N <b>C</b> K <b>E</b> F <b>G</b> V <b>E</b> L <b>Y</b> D <b>.</b> L <b>N</b> H <b>P</b> Y <b>Q</b> G <b>I</b> V <b>M</b> G <b>..<b>P</b>E</b> Q <b>G</b> V <b>T</b> L <b>P</b> G <b>M</b> T <b>I</b> E <b>M</b> G <b>A</b> S <b>K</b> A <b>G</b> L <b>V</b> A <b>P</b> E <b>T</b> F <b>N</b> Y <b>V</b> K <b>G</b> R <b>L</b> H <b>A</b> P <b>K</b> .. <b>G</b> K <b>D</b> F <b>D</b> A <b>V</b> A <b>Y</b> W <b>K</b> T <b>L</b> Q <b>T</b> D <b>E</b> G <b>A</b> T <b>F</b> D <b>T</b> V <b>V</b> T <b>L</b> Q <b>A</b> E <b>E</b> I
AVLEUC	89	P <b>G</b> R <b>E</b> L <b>R</b> R <b>V</b> R <b>H</b> R <b>R</b> V <b>Q</b> D <b>E</b> R <b>P</b> A <b>P</b> G <b>H</b> R <b>P</b> C <b>G</b> R <b>P</b> G <b>A</b> G <b>R</b> H <b>L</b> P <b>G</b> M <b>T</b> V <b>V</b> C <b>G</b> D <b>S</b> H <b>T</b> S <b>T</b> H <b>..<b>W</b>C</b> G <b>A</b> L <b>A</b> H <b>G</b> I <b>G</b> T <b>S</b> E <b>V</b> E <b>H</b> V <b>L</b> A <b>T</b> Q <b>C</b> L <b>V</b> A <b>K</b> K <b>M</b> K <b>N</b> M <b>Q</b> V <b>R</b> V <b>E</b> G <b>E</b> L <b>P</b> L <b>G</b> V <b>S</b> A <b>K</b> D <b>I</b> V <b>L</b>
RPID	192	H <b>I</b> I <b>G</b> V <b>I</b> G <b>T</b> A <b>G</b> G <b>T</b> G <b>C</b> V <b>I</b> E <b>F</b> C <b>G</b> S <b>A</b> F <b>E</b> Q <b>M</b> S <b>M</b> E <b>A</b> R <b>M</b> S <b>V</b> C <b>N</b> M <b>S</b> I <b>E</b> A <b>G</b> A <b>R</b> A <b>G</b> M <b>I</b> A <b>P</b> D <b>E</b> T <b>T</b> F <b>E</b> Y <b>I</b> R <b>G</b> R <b>P</b> L <b>A</b> P <b>T</b> .. <b>G</b> A <b>E</b> W <b>D</b> K <b>A</b> V <b>E</b> Y <b>W</b> R <b>S</b> L <b>R</b> S <b>D</b> P <b>D</b> A <b>K</b> Y <b>D</b> V <b>D</b> V <b>F</b> I <b>D</b> A <b>A</b> D <b>I</b>
SPID	198	H <b>I</b> I <b>G</b> V <b>I</b> G <b>T</b> A <b>G</b> G <b>T</b> G <b>S</b> V <b>I</b> E <b>F</b> C <b>G</b> E <b>A</b> I <b>E</b> G <b>L</b> S <b>M</b> E <b>A</b> R <b>M</b> S <b>M</b> C <b>N</b> M <b>S</b> I <b>E</b> A <b>G</b> A <b>R</b> A <b>G</b> M <b>I</b> A <b>P</b> D <b>A</b> T <b>T</b> F <b>E</b> Y <b>V</b> K <b>N</b> R <b>P</b> L <b>A</b> P <b>K</b> .. <b>G</b> D <b>D</b> W <b>E</b> Q <b>A</b> V <b>A</b> Y <b>W</b> K <b>T</b> L <b>R</b> S <b>D</b> E <b>N</b> A <b>K</b> Y <b>D</b> I <b>E</b> V <b>E</b> I <b>N</b> A <b>A</b> D <b>V</b>
SMLEUC'	168	A <b>I</b> I <b>G</b> E <b>I</b> G <b>T</b> A <b>G</b> G <b>T</b> G <b>H</b> V <b>I</b> E <b>F</b> A <b>G</b> E <b>A</b> I <b>R</b> S <b>L</b> S <b>M</b> E <b>G</b> R <b>M</b> T <b>V</b> C <b>N</b> M <b>T</b> I <b>E</b> G <b>A</b> R <b>A</b> G <b>L</b> I <b>A</b> P <b>D</b> E <b>T</b> T <b>F</b> E <b>Y</b> I <b>K</b> D <b>K</b> P <b>R</b> A <b>P</b> K <b>..<b>G</b>E</b> A <b>W</b> D <b>R</b> A <b>V</b> E <b>Y</b> W <b>K</b> T <b>L</b> H <b>M</b> D <b>E</b> G <b>A</b> H <b>Y</b> D <b>R</b> V <b>V</b> V <b>L</b> D <b>A</b> A <b>N</b> L
UMID	193	H <b>I</b> I <b>G</b> L <b>I</b> G <b>T</b> A <b>G</b> G <b>T</b> G <b>H</b> V <b>I</b> E <b>Y</b> A <b>G</b> S <b>T</b> I <b>R</b> S <b>L</b> S <b>M</b> E <b>A</b> R <b>M</b> S <b>I</b> C <b>N</b> M <b>S</b> I <b>E</b> A <b>G</b> A <b>R</b> A <b>G</b> L <b>I</b> A <b>P</b> D <b>E</b> I <b>T</b> Y <b>E</b> Y <b>I</b> K <b>G</b> R <b>P</b> L <b>A</b> P <b>K</b> Q <b>E</b> A <b>W</b> D <b>Q</b> A <b>L</b> A <b>Y</b> W <b>K</b> T <b>L</b> P <b>S</b> D <b>E</b> G <b>A</b> Q <b>Y</b> D <b>T</b> V <b>I</b> K <b>I</b> D <b>A</b> K <b>D</b> I
ECLEUC	185	A <b>I</b> I <b>G</b> K <b>T</b> G <b>S</b> A <b>G</b> G <b>T</b> G <b>H</b> V <b>V</b> E <b>F</b> C <b>G</b> E <b>A</b> I <b>R</b> D <b>L</b> S <b>M</b> E <b>G</b> R <b>M</b> T <b>L</b> C <b>N</b> M <b>A</b> I <b>E</b> A <b>G</b> A <b>K</b> A <b>G</b> L <b>V</b> A <b>P</b> E <b>T</b> F <b>N</b> Y <b>V</b> K <b>G</b> R <b>L</b> H <b>A</b> P <b>K</b> .. <b>G</b> K <b>D</b> F <b>D</b> A <b>V</b> A <b>Y</b> W <b>K</b> T <b>L</b> Q <b>T</b> D <b>E</b> G <b>A</b> T <b>F</b> D <b>T</b> V <b>V</b> T <b>L</b> Q <b>A</b> E <b>E</b> I
AVLEUC	188	A <b>V</b> I <b>G</b> R <b>I</b> G <b>T</b> A <b>G</b> G <b>T</b> G <b>H</b> A <b>L</b> E <b>F</b> A <b>G</b> S <b>A</b> I <b>R</b> G <b>L</b> S <b>M</b> E <b>G</b> R <b>M</b> T <b>L</b> C <b>N</b> M <b>A</b> I <b>E</b> A <b>G</b> A <b>R</b> V <b>M</b> V <b>A</b> V <b>D</b> E <b>K</b> T <b>I</b> D <b>Y</b> V <b>K</b> G <b>R</b> P <b>Y</b> A <b>P</b> Q <b>..<b>G</b>A</b> D <b>W</b> D <b>K</b> A <b>V</b> A <b>Q</b> W <b>R</b> E <b>L</b> V <b>S</b> D <b>A</b> D <b>A</b> G <b>F</b> D <b>T</b> V <b>V</b> E <b>L</b> K <b>A</b> E <b>E</b> I
RPID	291	A <b>P</b> T <b>L</b> T <b>W</b> G <b>T</b> S <b>P</b> Q <b>D</b> V <b>V</b> A <b>I</b> T <b>G</b> T <b>T</b> P <b>D</b> P <b>S</b> T <b>V</b> S <b>D</b> P <b>I</b> R <b>R</b> Q <b>A</b> M <b>E</b> R <b>A</b> L <b>D</b> Y <b>I</b> G <b>L</b> K <b>P</b> N <b>T</b> P <b>M</b> Q <b>E</b> V <b>K</b> I <b>D</b> K <b>V</b> F <b>I</b> G <b>S</b> C <b>T</b> N <b>S</b> R <b>I</b> E <b>D</b> L <b>R</b> A <b>A</b> A <b>A</b> I <b>A</b> K <b>G</b> R <b>H</b> V <b>A</b> D <b>W</b> V <b>Y</b> .. <b>A</b> M <b>V</b> V <b>P</b> G <b>S</b> G <b>L</b> V <b>K</b>
SPID	297	L <b>P</b> T <b>V</b> T <b>W</b> G <b>T</b> S <b>P</b> Q <b>D</b> V <b>I</b> P <b>I</b> N <b>G</b> N <b>I</b> P <b>D</b> P <b>A</b> H <b>V</b> K <b>D</b> N <b>V</b> R <b>A</b> A <b>S</b> I <b>Q</b> R <b>S</b> L <b>E</b> Y <b>M</b> G <b>L</b> K <b>P</b> N <b>T</b> S <b>I</b> V <b>S</b> Y <b>P</b> I <b>D</b> K <b>V</b> F <b>I</b> G <b>S</b> C <b>T</b> N <b>S</b> R <b>I</b> E <b>D</b> L <b>R</b> L <b>A</b> A <b>V</b> V <b>K</b> G <b>R</b> K <b>V</b> A <b>A</b> N <b>V</b> K <b>D</b> A <b>M</b> I <b>V</b> P <b>G</b> S <b>G</b> L <b>V</b> K
SMLEUC'	267	P <b>P</b> I <b>V</b> S <b>W</b> G <b>S</b> S <b>P</b> E <b>D</b> V <b>V</b> S <b>V</b> Q <b>G</b> V <b>V</b> P <b>N</b> P <b>D</b> D <b>I</b> Q <b>D</b> E <b>T</b> K <b>R</b> T <b>S</b> K <b>W</b> R <b>A</b> L <b>D</b> Y <b>M</b> G <b>L</b> K <b>P</b> G <b>T</b> K <b>I</b> T <b>D</b> I <b>A</b> I <b>D</b> R <b>V</b> F <b>I</b> G <b>S</b> C <b>T</b> N <b>G</b> R <b>I</b> E <b>D</b> L <b>R</b> A <b>V</b> A <b>E</b> V <b>V</b> E <b>G</b> R <b>K</b> V <b>S</b> P <b>T</b> V <b>S</b> .. <b>A</b> M <b>I</b> V <b>P</b> G <b>S</b> G <b>L</b> V <b>K</b>
UMID	293	P <b>P</b> T <b>V</b> T <b>W</b> G <b>T</b> S <b>P</b> Q <b>D</b> V <b>V</b> A <b>I</b> T <b>G</b> T <b>V</b> P <b>D</b> P <b>K</b> N <b>A</b> S <b>N</b> E <b>A</b> E <b>A</b> K <b>A</b> W <b>T</b> R <b>A</b> L <b>E</b> Y <b>M</b> G <b>L</b> E <b>A</b> G <b>T</b> P <b>M</b> E <b>K</b> I <b>K</b> I <b>D</b> K <b>V</b> F <b>I</b> G <b>S</b> C <b>T</b> N <b>A</b> R <b>I</b> E <b>D</b> L <b>R</b> A <b>A</b> A <b>R</b> V <b>L</b> H <b>G</b> R <b>K</b> V <b>A</b> D <b>G</b> L <b>Y</b> .. <b>C</b> M <b>L</b> V <b>P</b> G <b>S</b> G <b>L</b> V <b>K</b>
ECLEUC	284	S <b>P</b> Q <b>V</b> T <b>W</b> G <b>T</b> N <b>P</b> G <b>Q</b> V <b>I</b> S <b>V</b> N <b>D</b> N <b>I</b> P <b>D</b> P <b>A</b> S <b>F</b> A <b>D</b> P <b>V</b> E <b>R</b> A <b>S</b> A <b>E</b> K <b>A</b> L <b>A</b> Y <b>M</b> G <b>L</b> K <b>P</b> G <b>I</b> P <b>L</b> T <b>E</b> V <b>A</b> I <b>D</b> K <b>V</b> F <b>I</b> G <b>S</b> C <b>T</b> N <b>S</b> R <b>I</b> E <b>D</b> L <b>R</b> A <b>A</b> A <b>E</b> I <b>V</b> K <b>G</b> R <b>K</b> V <b>A</b> P <b>G</b> V <b>Q</b> .. <b>A</b> L <b>V</b> V <b>P</b> G <b>S</b> G <b>P</b> V <b>K</b>
AVLEUC	287	R <b>P</b> Q <b>V</b> T <b>W</b> G <b>T</b> S <b>P</b> E <b>M</b> V <b>L</b> P <b>V</b> D <b>E</b> R <b>V</b> P <b>D</b> P <b>A</b> S <b>E</b> S <b>D</b> P <b>V</b> K <b>R</b> D <b>S</b> I <b>V</b> R <b>A</b> L <b>K</b> Y <b>M</b> G <b>L</b> A <b>A</b> N <b>Q</b> P <b>I</b> G <b>E</b> I <b>K</b> V <b>D</b> R <b>V</b> F <b>I</b> G <b>S</b> C <b>T</b> N <b>S</b> R <b>I</b> E <b>D</b> L <b>R</b> A <b>A</b> A <b>E</b> V <b>A</b> K <b>G</b> A <b>R</b> S <b>P</b> R <b>A</b> S <b>S</b> R <b>R</b> W <b>W</b> C <b>R</b> A <b>P</b> G <b>W</b> S <b>R</b>
RPID	390	K <b>Q</b> A <b>E</b> A <b>E</b> G <b>L</b> D <b>R</b> I <b>F</b> K <b>E</b> A <b>G</b> F <b>D</b> W <b>R</b> E <b>A</b> G <b>C</b> S <b>M</b> C <b>L</b> G <b>M</b> N <b>P</b> D <b>Q</b> L <b>K</b> P <b>G</b> E <b>R</b> C <b>A</b> S <b>T</b> S <b>N</b> R <b>N</b> F <b>E</b> G <b>R</b> Q <b>G</b> A <b>G</b> G <b>R</b> T <b>H</b> L <b>M</b> S <b>P</b> A <b>M</b> A <b>A</b> A <b>A</b> A <b>V</b> T <b>G</b> Y <b>F</b> T <b>D</b> V <b>R</b> K <b>L</b> T <b>P</b> A <b>Q</b> Q <b>D</b> .....R
SPID	397	K <b>M</b> A <b>E</b> A <b>E</b> G <b>L</b> D <b>Q</b> I <b>F</b> I <b>E</b> A <b>G</b> F <b>D</b> W <b>R</b> E <b>A</b> G <b>C</b> S <b>M</b> C <b>L</b> G <b>M</b> N <b>P</b> D <b>Q</b> L <b>K</b> P <b>Y</b> E <b>R</b> C <b>A</b> S <b>T</b> S <b>N</b> R <b>N</b> F <b>E</b> G <b>R</b> Q <b>G</b> A <b>K</b> G <b>R</b> T <b>H</b> L <b>V</b> S <b>P</b> A <b>M</b> A <b>A</b> A <b>A</b> A <b>I</b> K <b>G</b> H <b>L</b> C <b>N</b> V <b>R</b> E <b>F</b> F <b>G</b> D <b>V</b> S <b>N</b> G.....S
SMLEUC'	366	E <b>Q</b> A <b>E</b> A <b>E</b> G <b>L</b> D <b>K</b> I <b>F</b> K <b>E</b> A <b>G</b> F <b>D</b> W <b>R</b> E <b>P</b> G <b>C</b> S <b>M</b> C <b>L</b> A <b>M</b> N <b>D</b> R <b>L</b> K <b>P</b> G <b>E</b> R <b>C</b> A <b>S</b> T <b>S</b> N <b>R</b> N <b>F</b> E <b>G</b> R <b>Q</b> G <b>F</b> K <b>G</b> R <b>T</b> H <b>L</b> S <b>P</b> A <b>M</b> A <b>A</b> A <b>A</b> A <b>V</b> A <b>G</b> H <b>F</b> V <b>D</b> I <b>R</b> E <b>W</b> K.....
UMID	392	K <b>Q</b> A <b>E</b> A <b>E</b> G <b>L</b> D <b>K</b> I <b>F</b> Q <b>A</b> A <b>G</b> F <b>D</b> W <b>R</b> E <b>A</b> G <b>C</b> S <b>M</b> C <b>L</b> G <b>M</b> N <b>P</b> D <b>Q</b> L <b>A</b> P <b>G</b> E <b>R</b> C <b>A</b> S <b>T</b> S <b>N</b> R <b>N</b> F <b>E</b> G <b>R</b> Q <b>G</b> A <b>G</b> G <b>R</b> T <b>H</b> L <b>M</b> S <b>P</b> A <b>M</b> A <b>A</b> A <b>A</b> C <b>A</b> V <b>T</b> G <b>Y</b> L <b>T</b> D <b>V</b> R <b>K</b> V <b>V</b> G <b>H</b> S <b>S</b> A <b>K</b> V <b>G</b> S <b>D</b> A <b>A</b> K <b>P</b> A <b>F</b> E
ECLEUC	383	A <b>Q</b> A <b>E</b> A <b>E</b> G <b>L</b> D <b>K</b> I <b>F</b> I <b>E</b> A <b>G</b> F <b>E</b> W <b>R</b> L <b>P</b> G <b>C</b> S <b>M</b> C <b>L</b> A <b>M</b> N <b>D</b> R <b>L</b> N <b>P</b> G <b>E</b> R <b>C</b> A <b>S</b> T <b>S</b> N <b>R</b> N <b>F</b> E <b>G</b> R <b>Q</b> R <b>G</b> G <b>R</b> T <b>H</b> L <b>V</b> S <b>P</b> A <b>M</b> A <b>A</b> A <b>A</b> A <b>V</b> T <b>G</b> H <b>F</b> A <b>D</b> I <b>R</b> N <b>I</b> K.....
AVLEUC	387	S <b>R</b> R <b>R</b> R <b>R</b> G <b>W</b> T <b>G</b> S <b>S</b> S <b>R</b> P <b>V</b> S <b>S</b> G <b>..<b>A</b>T</b> G <b>C</b> S <b>M</b> C <b>L</b> A <b>M</b> N <b>P</b> D <b>R</b> L <b>E</b> S <b>G</b> E <b>H</b> C <b>A</b> S <b>T</b> S <b>N</b> R <b>N</b> F <b>E</b> G <b>R</b> Q <b>G</b> A <b>G</b> G <b>R</b> T <b>H</b> L <b>V</b> S <b>P</b> A <b>M</b> A <b>A</b> A <b>A</b> A <b>V</b> A <b>G</b> R <b>F</b> V <b>D</b> V <b>R</b> Q <b>L</b> L <b>Q</b> A.....
RPID	479	P <b>A</b> S <b>P</b> T <b>P</b> K <b>K</b> I <b>E</b> T <b>E</b> L <b>E</b> P <b>P</b> V <b>E</b> D <b>H</b> A <b>K</b> A <b>A</b> D <b>Q</b> A <b>D</b> I <b>V</b> T <b>D</b> A <b>P</b> A <b>T</b> G <b>A</b> S <b>P</b> P <b>S</b> P <b>A</b> P <b>S</b> D <b>A</b> A <b>G</b> M <b>P</b> K <b>F</b> T <b>T</b> L <b>R</b> G <b>Y</b> A <b>A</b> P <b>L</b> D <b>I</b> A <b>N</b> V <b>D</b> T <b>D</b> M <b>I</b> I <b>P</b> K <b>Q</b> F <b>L</b> K <b>T</b> I <b>K</b> R <b>T</b> G <b>L</b> G <b>T</b> A <b>L</b> F <b>Y</b> N <b>I</b> R <b>F</b> D <b>G</b>
SPID	487	P <b>S</b> I <b>I</b> T <b>N</b> K <b>N</b> Y <b>D</b> P <b>S</b> H <b>D</b> V <b>E</b> G <b>D</b> I <b>G</b> L <b>S</b> V <b>D</b> D <b>A</b> T <b>D</b> A <b>V</b> T <b>D</b> A <b>D</b> G <b>I</b> A <b>T</b> N <b>V</b> A <b>G</b> S <b>V</b> S <b>S</b> G <b>S</b> A <b>G</b> I <b>P</b> K <b>F</b> T <b>V</b> V <b>E</b> G <b>I</b> A <b>A</b> P <b>L</b> P <b>M</b> A <b>N</b> V <b>D</b> T <b>D</b> K <b>I</b> I <b>P</b> K <b>Q</b> F <b>L</b> K <b>T</b> I <b>K</b> R <b>T</b> G <b>L</b> G <b>Q</b> F <b>A</b> F <b>Y</b> E <b>I</b> R <b>Y</b> D.. <b></b>
SMLEUC'		.....
UMID	492	I <b>E</b> V <b>S</b> D <b>A</b> K <b>S</b> Y <b>L</b> V <b>D</b> A <b>T</b> P <b>A</b> P <b>A</b> P <b>T</b> N <b>V</b> A <b>A</b> A <b>G</b> A <b>G</b> A <b>L</b> T <b>D</b> E <b>D</b> A <b>L</b> R <b>D</b> V <b>P</b> A <b>S</b> H <b>I</b> S <b>S</b> S <b>G</b> G <b>G</b> M <b>E</b> K <b>F</b> T <b>T</b> L <b>T</b> G <b>I</b> A <b>A</b> P <b>L</b> E <b>R</b> S <b>N</b> V <b>D</b> T <b>D</b> L <b>I</b> I <b>P</b> K <b>Q</b> F <b>L</b> K <b>T</b> I <b>K</b> R <b>T</b> G <b>L</b> G <b>S</b> A <b>L</b> F <b>W</b> P <b>L</b> R <b>Y</b> D <b>A</b>
ECLEUC		.....
AVLEUC		.....
RPID	579	A <b>T</b> G <b>E</b> E <b>N</b> P <b>D</b> F <b>V</b> L <b>N</b> Q <b>E</b> P <b>Y</b> R <b>Q</b> S <b>R</b> I <b>L</b> V <b>C</b> T <b>G</b> P <b>N</b> F <b>G</b> C <b>S</b> S <b>R</b> E <b>H</b> A <b>P</b> W <b>A</b> F <b>N</b> D <b>F</b> G <b>I</b> R <b>S</b> I <b>I</b> A <b>P</b> S <b>F</b> A <b>D</b> I <b>F</b> F <b>N</b> N <b>C</b> F <b>K</b> N <b>G</b> M <b>L</b> P <b>I</b> T <b>L</b> P <b>Q</b> D <b>K</b> V <b>E</b> M <b>L</b> A <b>E</b> H <b>A</b> K <b>Q</b> K <b>A</b> E <b>L</b> E <b>V</b> D <b>L</b> V <b>N</b> Q <b>V</b> V

## Resultados

---

## Resultados

```

SPID      586  ADGKEIPDFVLNREPYRHATVLVAH.DNFGCGSSREHAPWALNDFGIRVIIAPSFADIFFNCFKNGMLPIPTPIEQVNDMMKAAENQVKFSVDLVNQTI
SMLEUC '  .....
UMID      592  KTGEPPPAFVLNQKPYDQSKILVVTGPNFGCGSSREHAAWSLLDFGIRAVIAESFGDIFRNNLTKNQQLPVVLSRAQIQRLTQDAKAGKQITVDLVDQLV
ECLEUC    .....
AVLEUC    .....

RPID      679  RYPGGE..VPFDVEPFRKHCLVNLGLDDIGLTMQKADLIEAFEAKRSQTPWLDGKDY...AGKATKFTPVATNTAKKQKLDW
SPID      685  TYGDKQ..VKFDVEPFRKHCLVNLGLDDIGLTLQKETMIDAFEAAAREENFPWMNIK.....RSRARLSPVKSQSSSRNDW
SMLEUC '  .....
UMID      692  ITADGKEKFSFETPEFTRHCLINGLDDIALTLQDAQIGAFERNRSTHTPWLDGFGYHANSNSSLLDSAKPLVNNVTATDW
ECLEUC    .....
AVLEUC    .....
  
```

**FIGURA R.21. Alineamiento de la secuencia de aa de IPM deshidratasa de distintos organismos.** El alineamiento se realizó con el programa Clustal W. En color rojo aparecen los aa conservados en al menos 4 de las secuencias, en azul los cambios conservativos, y en color gris se muestran los cambios no conservativos. RPID, IPM deshidratasa de *Rhizomucor pusillus*; SPID, IPM deshidratasa de *Schizosaccharomyces pombe*; SM, *S. meliloti*; UMID, IPM deshidratasa de *Ustilago maydis*; EC, *E. coli*; AV, *Azotobacter vinelandii*.



Resultados

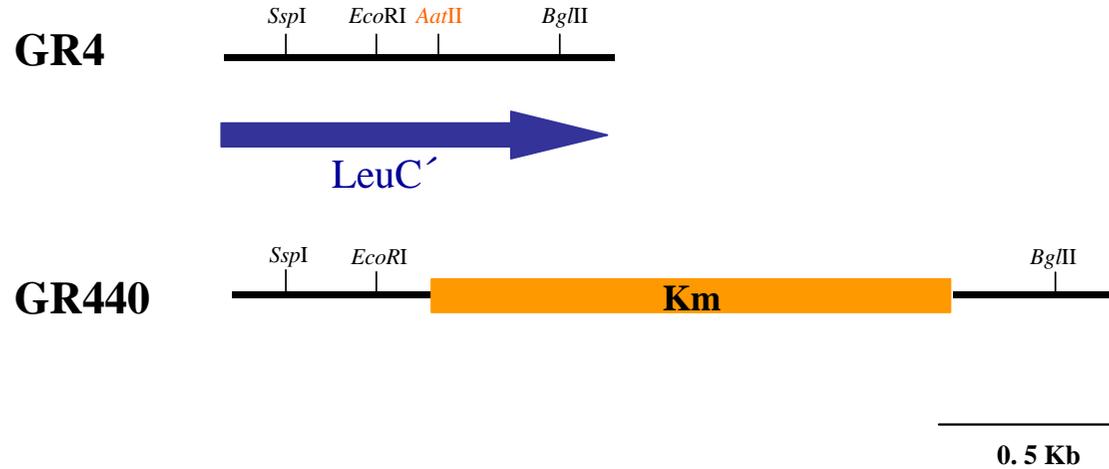


FIGURA R.22. Mutación de *leuC* de *S. meliloti* por inserción del gen de resistencia a kanamicina (Km) en el sitio *AatII*.

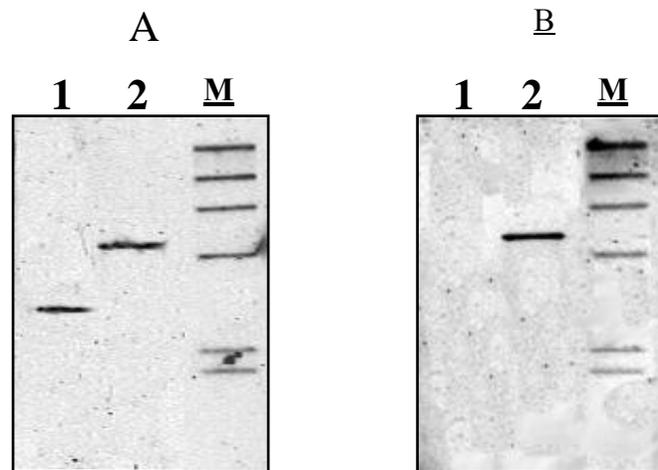


FIGURA R.23. Comprobación de la mutación en la cepa *leuC* GR440. A) Hibridación utilizando como sonda *leuC*; B) Sonda pHP45Ω-Km. 1) GR4/*EcoRI*; 2) GR440/*EcoRI*; M)  $\lambda$ -*HindIII*.



cepa silvestre (Fig. R.24). Estos resultados imposibilitan, a la espera de obtener cepas auxotrofas carentes de actividad IPM deshidratasa, verificar el papel de esta actividad enzimática de la ruta de biosíntesis de leucina en el establecimiento de la simbiosis con alfalfa.

#### 9. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN *LEUA* DE *R. LEGUMINOSARUM* BV. VICIAE UPM791

La estrategia utilizada para la caracterización de la región *leuA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 se basó en la complementación genética de la auxotrofia del mutante GR401 de *S. meliloti* con una genoteca de la cepa UPM791. Los cósmidos de la librería fueron introducidos en el mutante por conjugación triparental, seleccionando colonias capaces de crecer en MM con Tc, Km y sin leucina. Como resultado de esta complementación se identificaron tres cósmidos (pRlv7911, pRlv7912 y pRlv7913), los cuales permitían crecer al mutante GR401 en MM sin leucina. Estos tres cósmidos contenían varios fragmentos *EcoRI* comunes, entre ellos uno de 3.7 Kb. La hibridación de los tres cósmidos digeridos con *EcoRI* frente a una sonda marcada del gen *leuA* de *S. meliloti* (Fig. R.25), reveló que presentaban señal de hibridación en un fragmento de 3.7 kb. Además, como muestra la figura R.25, presentaban una segunda señal más débil en un fragmento de mayor tamaño, lo cual indicaba que el gen *leuA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* no se encontraba de forma completa en el fragmento de 3.7 kb.

El fragmento *EcoRI* de 3.7 kb fue clonado en el vector pUC18, obteniendo el plásmido pSPL1 (Fig. R.26), el cual se secuenció en ambas cadenas. También se clonó en pBlueScript un fragmento *XhoI* de 4 kb del cósmido pRlv7911, el cual también hibridaba con el gen *leuA* de *S. meliloti*, obteniendo el plásmido pSPL2 (Fig. R.26). Se subclonó el fragmento interno *EcoRI-XhoI*, obteniendo el plasmido pSPL22. (Fig. R.26).

El análisis de la secuencia de nucleótidos completa de los fragmentos *EcoRI* de 3.7 kb y *EcoRI-XhoI* de 1.14 kb permitió identificar 3 posibles marcos de lectura (ORFs), denominados ClpP, Orf422 y LeuA, los cuales se esquematizan en la figura R.26.

La proteína LeuA deducida de la secuencia contiene 591 aa, si bien esta sería de sólo 583 aa si se considera como codón de iniciación de la traducción el AUG en posición 2410 (Fig. R.27). LeuA de la cepa UPM791 es muy similar a LeuA de *S. meliloti*. Ambas proteínas muestran un 85% de identidad de secuencia. En la figura R.28A se detalla la gran

homología entre ambas proteínas. En la secuencia de LeuA de *R. leguminosarum* bv. viceae UPM791 también existen los dominios conservados en otras  $\alpha$ -isopropilmalato sintasas. (Fig. R.27).

Arriba de *leuA* se identificaron dos ORFs. Uno de ellos codifica para una proteína de 194 aa, que presenta gran homología con ClpP de *S. meliloti*. El alineamiento de ClpP de *S. meliloti* y de *R. leguminosarum* bv. viceae se muestra en la figura R.28B.

A diferencia de lo que ocurre en *S. meliloti*, entre LeuA y ClpP, se identificó una posible proteína (Orf 422), cuya secuencia muestra homología con una proteína de membrana transportadora de benzoato (BenE) presente en diversas bacterias. En la figura R.29 se muestra el alineamiento de la secuencia de este Orf 422 y las correspondientes BenE de otras bacterias (*Acinetobacter calcoaceticus*, *E. coli* y *Pseudomonas putida*).

Corriente abajo de *leuA* no se ha identificado ningún posible Orf que muestre homología con secuencias de proteínas depositadas en los bancos de datos.

### 10. ANALISIS FILOGENÉTICO DE LOS GENES *LEUA* DE *S. MELILOTI* Y *R. LEGUMINOSARUM*

Como se muestra en la Fig. R.28A, las proteínas LeuA de *S. meliloti* y *R. leguminosarum* bv. viceae son muy parecidas en su secuencia. Al igual que se había observado para LeuA de *S. meliloti* GR4, la secuencia de aa de la proteína LeuA de *R. leguminosarum* UPM791 es más parecida a la secuencia de  $\alpha$ -IPM sintasas de bacterias Gram-positivas y levaduras que a las de otras bacterias Gram-negativas, filogenéticamente más cercanas a *Rhizobium* (datos no presentados). Una posible explicación a esta aparente paradoja es que el gen *leuA* de *Rhizobium* haya sido objeto de transferencia lateral. Por ello se llevó a cabo un análisis filogenético de  $\alpha$ -IPM sintasas de distintos orígenes en base a la secuencia de aa de estas proteínas. Este estudio se llevó a cabo con la secuencia deducida para  $\alpha$ -IPM sintasas de 20 organismos diferentes, fundamentalmente bacterias, cianobacterias, plantas y levaduras. Se realizó un alineamiento de las secuencias con el programa ClustalW, a partir del cual se realizó un análisis con el paquete de programas PHYLIPP hasta obtener el dendograma de la Fig. R.30. El resultado, con ser limitado por el número de secuencias empleadas, deja ver de manera bastante gráfica la mezcla

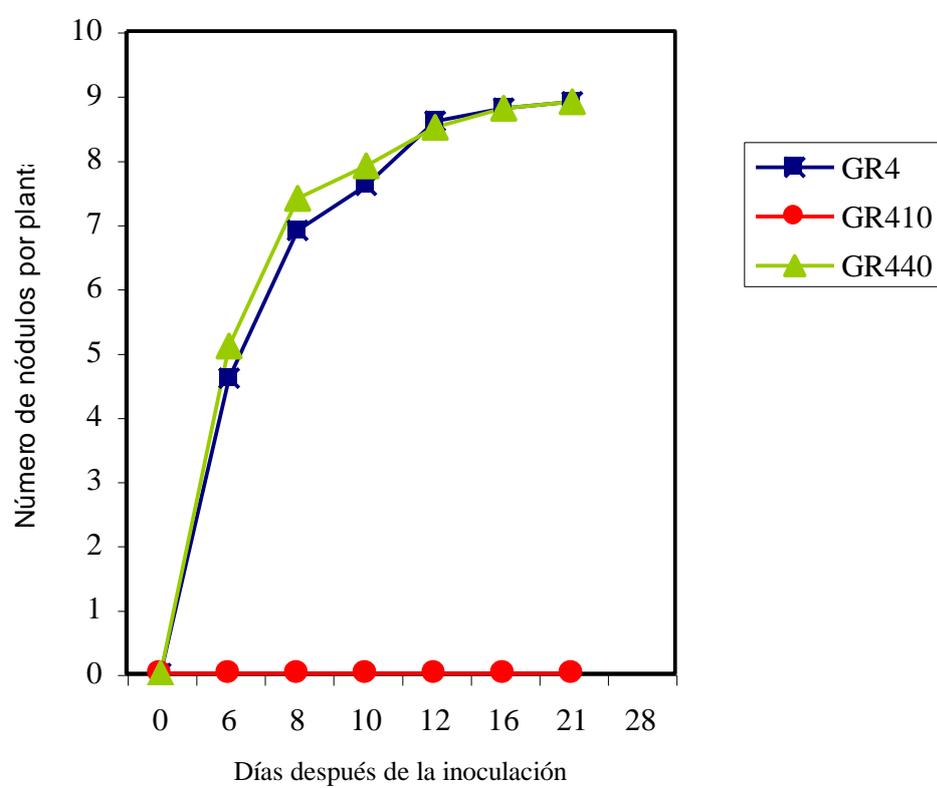
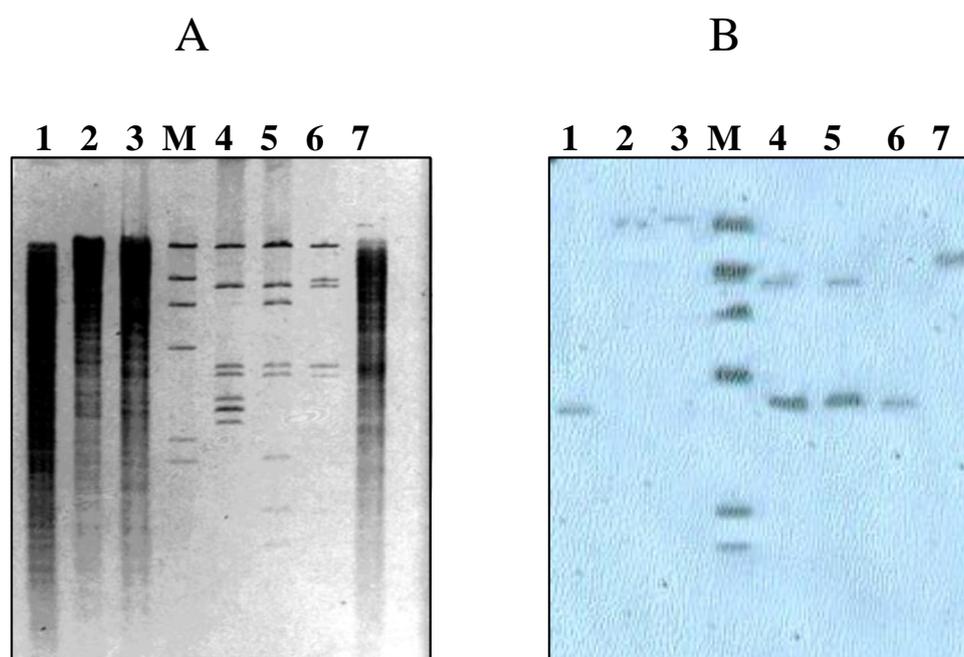


Figura R.24. Cinética de nodulación de la cepa GR440 (*leuC*) de *S. meliloti* en alfalfa.



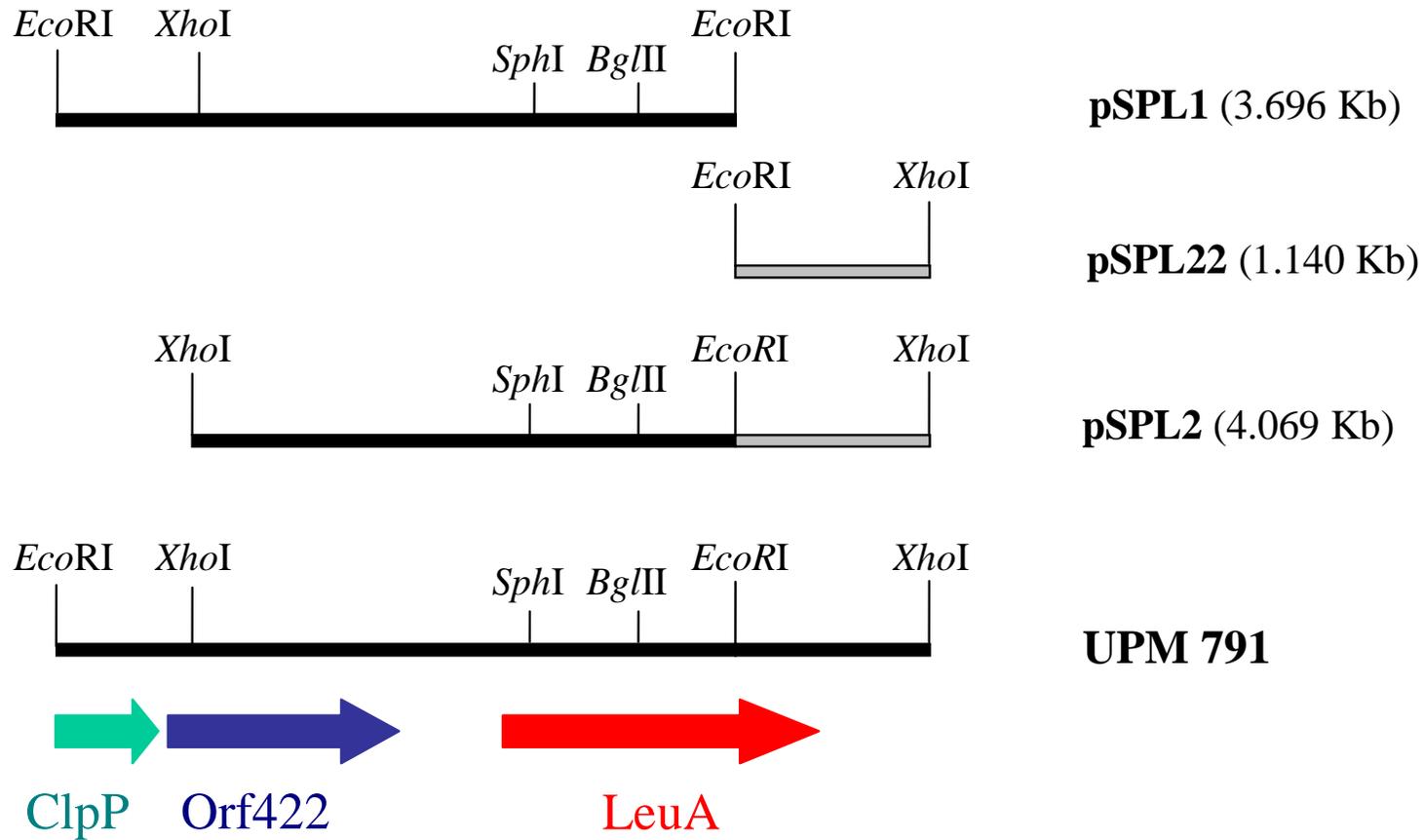


**FIGURA R.25. Aislamiento del gen *leuA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791.**

**A:** Perfil de restricción de cósmidos que complementan la auxotrofia de GR401. **B:** Hibridaciones frente a *leuA* de *S. meliloti*.

1) ADN de UPM791 digerido con *EcoRI*; 2) ADN de UPM791 digerido con *BamHI*; 3) ADN de UPM791 digerido con *HindIII*; 4-6) pRlv7911, pRlv7912 y pRlv7913, respectivamente, digeridos con *EcoRI*; 7) ADN de GR401 digerido con *EcoRI*; M)  $\lambda$ -*HindIII*





**FIGURA R.26.** Mapa genético de la región *leuA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791. Se muestran el fragmento *EcoRI/XhoI* secuenciado y los Orfs identificados, así como los subclones empleados para la obtención de la secuencia.



10 30 50 70 90  
 GAATTCATCTCCAAGAGGTTTCGAATGAACGACGAAGACCAGGACGACAAGACGAAGGAAC TGCCGCTCGGCAAGGAAACGGAGGCGAATC  
 M N D E D Q D D K T K E L P L G K E T E A N L

**ClpP →**

110 130 150 170  
 TTTTCAAGTCGCGTTCGATCTTCATCTACGGACCGATCAATCAGGAAITGGCGCAGAAGGTCTGCTCGCAGCTTGTGGCGCTTGTCTGCTG  
 F K S R S I F I Y G P I N Q E L A Q K V C S Q L V A L A A A

190 210 230 250 270  
 CCAGCGACGAGGACATCCGCATCTATGTCAATTGCCCCGGCGGCCACGTCGAATCCGGCGATTCCATTTCATGACATGATCAAGTTTCATCA  
 S D E D I R I Y V N S P G G H V E S G D S I H D M I K F I K

290 310 330 350  
 AGCCGAAGGTCTGGATGATCGGCACCGGTTGGGTGCGCTCCGCCGGCGCACTGATCTATGTGCGCCACTCCGAAGGAGCGGCCCTGTGCC  
 P K V W M I G T G W V A S A G A L I Y V A T P K E R R L C L

370 390 410 430 450  
 TGCCGAACACGCGCTTCCTGCTGCATCAGCCCTCCGGCGGCACGCGCGGCATGGCATCCGACATCGAAATCCAGGCGCGGAGATCATCA  
 P N T R F L L H Q P S G G T R G M A S D I E I Q A R E I I K

470 490 510 530  
 AGATGAACGAGCGTCTGAACAGGATCATGGCAGCGGCCACCGGCCAGCCGCTCGACAAGATCGACAAGGATACGGATCGCGACTACTGGC  
 M N E R L N R I M A A A T G Q P L D K I D K D T D R D Y W L

550 570 590 610 630  
 TTTTCGGCCGAAGAGGCGAAGGAATATGGCCTCGTTTTCACGGATCGTGCAGTTCGCGAGGCCGATATCTGAGTTTTCCTCAGCCAAAAC TGCAA  
 S A E E A K E Y G L V S R I V T S Q A D I \*

650 670 690 710  
 GAACCCGCCCTTGCCTGCCGATCGCAGGTGAGGGCGTTCCTGTTTTTCGGATAGTGCTAGCGGCAAGGTCTGAACGGAAAGCAATGAATCCG  
 M N P

**ORF422 →**

730 750 770 790 810  
 GACTTGGCCCTTCGACAACCATCATGCTCCATGCGCCATTCGCGCAGCTCGAGTCCCGCCATGCTCAAAGATTTTTCCGTCCAAGCCCTG  
 D L R L R Q P S C S M R H S R S S S P A M L K D F S V Q A L

830 850 870 890  
 TTCATGGGGTTGCTGACCGCTTCGTCGGTTCGCCAGCTCCTTCGCCGTTGTGCTGCACGGGTGCAGGCGGTTCGGCGCTACGGATGTA  
 F M G L L T A F V G S A S S F A V V L H G L Q A V G A T D V

910 930 950 970 990  
 CAGGCGGCTTCGGGCTGATGGCATTGTCGATTTCCATGGGCGTCTGCGCGATCGTGC TAAAGTCCGTGACCCGATTGCCGGTCAAGCATC  
 Q A A S G L M A L S I S M G V C A I V L S A V T R L P V S I

1010 1030 1050 1070  
 GCCTGGTTCGACACCGGGTGCCGCACTGCTGGCAAGTACCGGGCGGTTCGAGGGCGGCTTCAATGCGGCGGTTCGGGCAATTCCTGATCTGT  
 A W S T P G A A L L A S T G A V E G G F N A A V G A F L I C

1090 1110 1130 1150 1170  
 GCTATGCTGATTTATCGTTTCGGGACTGTTCAAGCCGCTAGGGCGGGCGGTTGCCGCCATTCCGGCACCACCTCGCCAATGCGATGCTTGGC  
 A M L I I V A G L F K P L G R A V A A I P A P L A N A M L A

1190 1210 1230 1250  
 GGTGTGCTGATCGGCCCTGCTTTCGGCCGGTGAAGCGGATCGGCTTCAATCCGCTGTTTCGGCTGCCGATCGTCTGCGCTGGATCGTC  
 G V L I G L C F A P V K A I G F N P L F G L P I V V A W I V

## Resultados

1270 1290 1310 1330 1350  
GTCGGCGCCTTCAAGCGGCTTTGGGCGGTGCCGGCAGCACTCGCGCGGTTCGTGCTGGTGCCTTCGGCGCTCGATATCCCCGACGAT  
V G A F K R L W A V P A A L A A F V L V L A F G V D I P D D

1370 1390 1410 1430  
GCGCTCGGCTCGCTGGAACAATCACTGGTGCCGACGGTGGAGATCGTCCGGCCGGTGTCAATCTTGCCGCGCTCATCTCGATCGCGCTG  
A L G S L E Q S L V P T V E I V R P V F N L A G L I S I A L

1450 1470 1490 1510 1530  
CCGCTCTTCATCGTCACCATGGCCTCGCAGAACAATTCGGGTATCGCGGTGCTGAAGGTCAACCACTACGATCCAAAGCCCGGTCCGCTC  
P L F I V T M A S Q N I P G I A V L K V N H Y D P K P G P L

1550 1570 1590 1610  
TTTGGCGTCACCGGCTTCTTCTCGCTGCTGTCCGGCCGGTTCGGCGGCCACGCGGTCAATCTGGCAGCCATCACCGCGCAATGTGCCGC  
F A V T G F F S L L S A P F G G H A V N L A A I T A A M C A

1630 1650 1670 1690 1710  
GGACAGGACGCCCATGCCGATCCGAAGCGGCGCTATTGGGCGTCACTGATCGCCGGCGTCCGTTATATCATCTCCGGCTGCTCGCCGGC  
G Q D A H A D P K R R Y W A S L I A G V G Y I I L G L L A G

1730 1750 1770 1790  
GCGGTGACGGCCTTCGTTCGCGCTCGCACCTTCGATCCGTGATCGAGCGGTAGCGGGCTGGCGCTGGTCCGAGCCTTCTCGTCTCCGGCA  
A V T A F V A L A P S I L I E A V A G L A L V G A F S S S A

1810 1830 1850 1870 1890  
ATGTCGGCCTTCCAGGCGCCGACTCGCGAGAGGCGGCGCAATCACCTTCTTGTACCGCCTCCGGCATTTCCTTCGGCGGCATTTCC  
M S A F Q A P D S R E A A A I T F L V T A S G I S F G G I S

1910 1930 1950 1970  
GGTGCCTTCTGGGGCTGATCGCGGGTGGGCTGATGCTGGCGCTGTCCGGTGGTGAAGATTTGGAAAGACCAGCTCAGTCGAGGTAA  
G A F W G L I A G G L M L A L S R L V K I W K D R A Q S R \*

1990 2010 2030 2050 2070  
CGGAAGGTCGTTGTGCTCTCCAAATGCCGATTCTGGCGCTTTCAAGCAGCTCCGCCGGCAATAGCTGGGCAGTTGTCGAATGTTGGCG

2090 2110 2130 2150  
GCCACAAAAGCCGGCCAAGGACTTGCCAGCTTTACCGTCCGAGGCTATAAGCGCGGCATGAAGACCCTGGCGCCAGAATTTCTGACA

2170 2190 2210 2230 2250  
CGATTACACGCGCCGATCGCCCTGCGTGACAATACGCGGCCCTGACCTCGCTTCTTCTCCTCGGCCTTACGCGCGGTTGCCGGGTCC

2270 2290 2310 2330  
TTTGAGGAGCGCCCGCGCCGAAAGCCCGCCCGCCATCGCTCCTCGGACTCACTTTCAAATTTGACCTAACGACCAGCAAGGTCCGC

2350 2370 2390 2410 2430  
ATTTGTTTATCGCCAAGCCGACGTGATCGGCTAAGAGCGGCAATGCCGGACGAGGAGACGATACGATGGACGCGAAGACGCAATCT  
M P G R G D D T M D A K T Q S

**LeuA →**

2450 2470 2490 2510  
TCCCAAAATAAGGTGGCCTCCACAAACAAGACGGCCCCGCAAAGGCATGCCGACGCCCGTGAAATACCGGGCTATCCGCAGGTG  
S Q N K V A S T N K T A P A K G M P D A A V K Y R A Y P Q V

2530 2550 2570 2590 2610  
AACATTTCCCGACCGCACATGGCCGACGAAGACCAATTACCAAGGCACCGGTCTGGTGCCTCGGTCGACCTGCGCGACGCAACCAGGCGCTC  
N I P D R T W P T K T I T K A P V W C S V D L R D G N Q A L

2630 2650 2670 2690  
FTCGACCCGATGGGCCACGATCGCAAGGCGCGCATGTTCCAAGTCTGATCGAGATGGGCTTCAAGGAAATCGAGATCGGGTTCCCTCG  
J D P M G H D R K A R M F Q L L I E M G F K E I E I G F P S

## Resultados

2710 2730 2750 2770 2790  
GOTTTCGCAGACCGATTTTGGACTTTTGCCCGCTGGTGCCTGGAGGAGGGCAATGTGCCCGACGACGCTCTCCCTGCAGGTATTGGTACAGTGC  
A S Q T D F D F A R W C V E E G N V P D D V S L Q V L V Q C

2810 2830 2850 2870  
CGCCCGGAACCTCATCACCCGTACCTTCGAAGCACTGGAAGGGCGCAAATCGGCCGATCGTGCACCTTCTACAACCTCCACCAGCGATTGCAG  
R P E L I T R T F E A L E G A N R P I V H F Y N S T S E L Q

2890 2910 2930 2950 2970  
CGCCCGCTCGTCTTCGCCAAGGATGTGCGGGGGATCAAGCAGATCGCCGTCGATGCCGCCAAGATGATCACCGATATGGCCACGAAGGCC  
R R V V F A K D V R G I K Q I A V D A A K M I T D M A T K A

2990 3010 3030 3050  
GGCGGGGTTACCGTTTCGAATATTCGCCGGAGAGCTTTACCGGCACCGAACTCGATGTGGCGCTGGAGATCTGCAATGCCGTCATCGAG  
G G G Y R F E Y S P E S F T G T E L D V A L E I C N A V I E

3070 3090 3110 3130 3150  
GTCGTCAAGCCGACGCCGATAACAAGCTGATCATCAACCTGCCGTCCACCGTCGAGATGGCGAGCGCCGAACGCTCTATGCCGACCAGATC  
V V K P T P D N K L I I N L P S T V E M A T P N V Y A D Q I

3170 3190 3210 3230  
GAATGGATGTGCCGAACCTCGACAATCGTGAGAACCTGATCGTTTCCCTGCATCCGCATAACGATCGCGGCACCCGGCATCGCTGCTGCC  
E W M C R N L D N R E N L I V S L H P H N D R G T G I A A A

3250 3270 3290 3310 3330  
GAACTGGCATTGCTGGCAGGTGCCGACCCGCTCGAAGGCACGCTGTTCGGCAATGGCGAGCGTACCGGCAATGTCGACATGGTGACGATG  
E L A L L A G A D R V E G T L F G N G E R T G N V D M V T M

3350 3370 3390 3410  
GCGCTGAACATGTTACCGCAGGGCGTCGATCCCGAGATCGACTGCTCGAATATCGAGCGCATCAAGGAAGTGTTCGAATATTCGAACCAG  
A L N M F T Q G V D P E I D C S N I E R I K E V F E Y S N Q

3430 3450 3470 3490 3510  
ATGGCGATCGCGAGCGTCATCCTTACGTCGGCGAGCTGGTCTACACCCGCTTTTCCGGCTCGCATCAGGATCGCATCAACAAGGTATG  
M A I G E R H P Y V G E L V Y T A F S G S H Q D A I N K G M

3530 3550 3570 3590  
AAGGCAGCACAGGTCCGCAATCATCCCGTGTGGGAAGTCCCGTACCTGCCGATCGACCCGCGTGATGTCCGGTTCCTACGAGGCGGATC  
K A A Q V A N H P V W E V P Y L P I D P R D V G R S Y E A I

3610 3630 3650 3670 3690  
ATCCGCATCAACTCGCAGTCCGGCAAGGGCGGCATCGCCTATATCCTGCAACAGGATTACGGGCTGAACCTGCCGCGCAACCTGCAGGTG  
I R I N S Q S G K G G I A Y I L Q Q D Y G L N L P R N L Q V

3710 3730 3750 3770  
GAATTCGCGAAGATATCCAGCGCATCACCGACGTAGAGGGTAAAGAGCTTCCGTCCCGGCGCATCTATGACCGCTTCATCGAGCGCTAC  
E F R E D I Q R I T D V E G K E L P S R R I Y D R F I E R Y

3790 3810 3830 3850 3870  
GTGACGCAGCCGAAGGGCGCCTGCGCTTCGTCGACCATCACACCTATCCTGACACTGAGCACAAGGGCCAGCGGATCGTCGACGCCGAG  
V T Q P E G R L R F V D H H T Y P D T E H K G Q R I V A A E

3890 3910 3930 3950  
ATCACCGACAATGGGGATATCAAGCGCATCGAAGGGCGGGCAACGGTCCGATCGACCGCTTCATCAACGCGCTGTCCGATTTATCTCGGC  
I T D N G D I K R I E G R G N G P I D G F I N A L S H Y L G

3970 3990 4010 4030 4050  
ATCGAGATGTCCGTCGAGGACTATTCGAGCATTCGCTCCAGCATGGCTCGAACGCGAGCGGATCTCCTACGTCGAGACCTCCTATCCC  
I E M S V E D Y S E H S L Q H G S N A A A I S Y V E T S Y P

## Resultados

```

          4070          4090          4110          4130
GGTGGCAAAC TTTTCGGCGCGGGCATCAATACCAACATCGTCGCAGCTTCGCTGGAGGCGATCGTCTCGGCCGCAACCGCGTGCCTCGAC
G G K L F G A G I N T N I V A A S L E A I V S A A N R V L D

          4150          4170          4190          4210          4230
GTGAAGGCTGGCAAGGCCTGATTTTCGGCAGGTCTCAGGCCGCGATCGCACTACTGCATAATTCCTTAGATCGGAATCGATTCAAGGATAA
V K A G K A *

          4250          4270          4290          4310
AATATATGCAGCAATTCAAAATGTTACAGCGCCCTTTGCGCGTCTGAAAAGACGCGCGGCGCTGTAGCGCTGCGCGGCCCTGACGATGCAGT

          4330          4350          4370          4390          4410
CGGCGATCTCGTCCGGCTCGTCGCGCGCCTCGGGCGTGCCGCTGACCCATTGGCAGAGCGCCAGCAACACCGGTTTCGAGACCGAGGCCGA

          4430          4450          4470          4490
GTTTCGGTTCGCGCTGTATTTCGACGCGGCCGGGACTTCGGCGAAGATCTGGCGGGCGACCAGCCCGTGCTCCTCCATCTCGCGCAGCTGCT

          4510          4530          4550          4570          4590
GGATCAGCACCTTCTGGGTGATGGCGGGCATCATCCGCTTCAGCTCCGACAGACGCTTCGGGCCGAGAAGACGTAGTAGAGGATGACTG

          4610          4630          4650          4670
GCTTCCAGCGCCCCGAGATCACCTTGAGCGCGCTTCGACCGGAGTTTCGGCAGTCTTTTCATCGGCTCAGCCATGGTACCTCCTGGT

          4690          4710          4730          4750          4770
GGGTAGGGCACGAAAGAGTGTGTATTTTTGCCTGATATCCTATTGCTAAACCTGCCCCACGCCAATCAGACGTGAGGTTTCATCTGCCATG

          4790          4810
AAAGCCGTTCAATTCACCTCGCTTCGGTCCGCCCGATGTCCTCGAG

```

**FIGURA R.27. Secuencia de nucleótidos del fragmento *EcoRI-XhoI* que contiene el gen *leuA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791. Se muestra también la secuencia de aminoácidos de los ORFs identificados: ClpP, Orf422, LeuA. Los asteriscos (\*) indican codones de terminación de la traducción.**

**A**

```

RLLEUA 1  MPGRGDDTMDAKTQSSQNKVASTNKTAFAKGMFDAAVKYRAYPQVNIPDRTWPTKITKAPVWCSVDLRD
SMLEUA 1  .....MILKSHSIKTGMPEAAVKYQYPQIVLPDRTWPSKAITEAPIWCSVDLRD

RLLEUA 71  GNQALVDPMGHDKARMFQLLIEMGFKEIEIGFPSASQTDFDFARWCVEEGNPDDVSLQVLVQCRPELI
SMLEUA 51  GNQALVDPMGHDKARMFHLLLDMGFKEIEIGFPSASQTDYDFARWCVEEGNSEDVSLQVLVQCRPELI

RLLEUA 141 TRTFEALEGANRPIVHFYNSTSELQRRVVFAKDVRGIKQIAVDAAKMITDMATKAGGGYRFEYSPESFTG
SMLEUA 121 ARTFEALEGAHRPIVHFYNSTSELQRRVVFGKDVAGIKQIATDAAKMITDMAAKAGGGYRFEYSPESFTG

RLLEUA 211 TELDVALEICNAVIEVKPTPDNKLIINLPSTVEMATPNVYADQIEWMCRNLDNRENLIVSLHPHNDRGT
SMLEUA 191 TELEVALEICNAVIEIVRPTADNKLIINLPSTVEMATPNIYADQIEWMCRNLDNRENLIVSLHPHNDRGT

RLLEUA 281 GIAAAELLAGADRVEGTLFGNGERTGNVDMVTMALNMFTQGVDPEIDCSNIERIKEVFEYSNQMAIGE
SMLEUA 261 GIAATDLGLMAGADRVEGTLFGNGERTGNVDVTLALNMFTQGVDPKLDCSDIERIKEVYEYSNQMVIPE

RLLEUA 351 RHPYVGELVYTAFSGSHQDAINKGMKAAQVANHPVWEVPYLPIDPRDVGRSYEAIIRINSQSGKGGIAYI
SMLEUA 331 RHPYVGELVYTAFSGSHQDAINKGMKAIKQANKPTWEVPYLPIDPRDVGRSYEAIIRINSQSGKGGIAYI

RLLEUA 421 LQQDYGLNLPRNLQVEFREDIQRITDVEGKELPSRRIYDRFIERYVTQPEGRLRFVDHHTYPDTEHKGQR
SMLEUA 401 LQEDYGINLPRNLQIEFREEVQRITDEGKELPSKRIHQRFIESYVEQFARIKFVDHHTYPAGEHKLR

RLLEUA 491 IVAAEITDNGDIKRIEGRNGPIDGFINALSHYLGIEMSVEDYSEHSLQHGSNAAAISYVETSYPGGKLF
SMLEUA 471 VVAAEITDGGETRHIEGKTGPIDGFINALSIYLGIELSVADYSEHSLQHGSNAAAIAYVEVEYPGGKLF

RLLEUA 561 GAGINTNIVAASLEAIVSAANRVLDVKAGA
SMLEUA 541 GVGINTNIVAASLEAIVSAANRVLDVVGK..

```

**B**

```

RLCLPP 1  .MNDEDQDDKTKELPLGKETEANLFKSRSIFIYGPINQELAQKVCSQLVALAASDEDIRIYVNSPGGHV
SMCLPP 1  MRNDDQEEKTELPLGKETEANLFKSRSIFIYGTITQELAQKVCSQLVALAASDDIRLFVNSPGGHV

RLCLPP 70  ESGDSIHDMIKIFIKPKVWMIGTGWVASAGALIYVATPKERRLCLPNTRFLHQPSGGTRGMASDIEIQAR
SMCLPP 71  ESGDSIHDMIKIFVKPKVWTIGTGWASAGALIYVAPKEQRLCLPNTRFLHQPSGGTRGMASDIEIQAR

RLCLPP 140 EIIKMNERLNRIMAAATGQPLDKIDKDTDRDYWLSAEEAKEYGLVSRIVTSQADI
SMCLPP 141 EIIKMNERLNRIFSEATGQPVDKIAKDTDRDYWLGAEEAKAYGLVSRIVTSIAEI

```

**FIGURA R.28.** Alineamiento de la secuencia de aa de LeuA (A) y de ClpP (B) de *S. meliloti* (SM) y de *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 (RL). El alineamiento se realizó con el programa Clustal W. En color rojo aparecen los aa conservados, en azul los cambios conservativos, y en color gris se muestran los cambios no conservativos.



```

ACBENE      1  .....MT...TLLKTLK.....QDWSLSAT.....IAGFLAVL
PPBENE      1  .....MKTLI.....NDSSLSAI.....VAGCIATM
ECBENE      1  MVDKRRAR...FSMRLLR.....QNGSLSLVRYNGQMLRCLYAITHEVTMRLFSIPPTLLAGFLAVL
RLORF422    1  MNPDLRLRQPSCSMRHSRSSSPAMLKDFSVQAL.....FMGLLTAF

ACBENE      26  ISYSGPLIIFQAAQKAHVSTEMMISWIWAI SIGAAVTGIFLSIRFKTPVVTAWSAPGTALLV.TLFPNI
PPBENE      22  ISYAGPLVIFHAAEAAGLSHQQLSSWVAVSMGSAVLGALLSLRYRVPVVIAWSIPGSALLV.TALPQL
ECBENE      61  IGYASSAAIWQAAIVAGATTAQISGWM TALGLAMGVSTLTTLWYRVPVLTAWSTPGAALLV.TGLQGL
RLORF422    42  VGSASSFAVVLHGLQAVGATDVQAASGLMALDISMGCVAIVLSAVTRLPVSIAWSTPGAALLASTGAVEG

ACBENE      95  SLNEAVAAYITAAIVI FLVGTIGYFDKLLKWIPQGI AAGMMAGILFQFGLGLFLATDTLPLIVFSMLLCY
PPBENE      91  GLEQAVGAYLVANLLLLLIGISGAFDRIIARLPGSI AAGMQAGILFGFGIEVFRALPVQPLLVLAMFVTY
ECBENE     130  TLNEAIGVFIVTNALIVLCGITGLFARLMRIIPHS LAAMLAGILLRFGQLQAFASLDGQFTLCGSMLLVW
RLORF422    112  GFNAAVGAFLICAMLIIVAGL FPKLGRVAATAIPAPLANAMLAGVLI GLCFAPVKAIGFNPLFGLPIVVAV

ACBENE     165  LISRRFSPRYCMLWVLCIGVAFSFFLGMKNPVPL..DFQIARP..QFIAPESWFSSTLNALPLIILVSLT
PPBENE     161  VLMRRVQPRYAVA AVL CVGSLVTLASGAFRSEAL..VLELASP..QWITPQFSLPAVFSALPMVVALT
ECBENE     200  LATKAVAPRYAVIAAMIIGIVIVIAQGDVVTDV..VFKPVL P..TYITPDFSFAHLSVALPLFLVTMA
RLORF422    182  IVVGAFKRLWAVPAALAAFVLVLAFGVDIPDDALGSL EQSLVPTVEIVRPVFNLAGLISIALPLFIVTMA

ACBENE     231  GQFLPGMAI LKLSGYNTPAKPIIAAASLASLFAAFAGGITIVLASITATLCMGKDAHELKDKRYIAGIAN
PPBENE     227  QFMPGMAVLRNAGYATPASPLISASALAGAVLAPFGCHGLNLA AVTASLCTGHEAHENPRRRYVA AVAG
ECBENE     266  SQNAPGIAAMKAAGYSAPVSP LIVFTGLLALVFS PFGVYSVGI AAITAAICQSPEAHPDKDQRWLA AVA
RLORF422    252  SQNIPGIAVLKVNHYDPKGP LFAVTFGFFSLLSAPFGGHAVNLAAITAAACAGQDAHADPKRRY WASLIA

ACBENE     301  GLFYVLGGVFAGSIVALFSLPKELVAALAGLALLGAIASNIKIAMQEDQQRDPALITFLATVSGMHFLG
PPBENE     297  STLYLLLGIAGATLMSLFAAFPAALIAALAGLALYGAMSEALARS LAEPAERDAGLFTFLVTASGVAF LG
ECBENE     336  GIFYLLAGLFGSAITGMMAALPVSWIQMLAGLALLSTIGGSLYQALHNERERDAAVVAFLVTASGLTLVG
RLORF422    322  GVGYYIILGLLAGAVTAFVALAPSI LIEAVAGLALVGAFSSSAMS AFQAPDSREAAITFLVTASGISFGG

ACBENE     371  LSSVFWGMCIGMLAYFIL..LKPKAS.....
PPBENE     367  LSAAFWGLLFGLLAHALLRLRQPLAGEVLRRT
ECBENE     406  IGSAFWGLIAGVCYVVLNLIADRNR.....
RLORF422    392  ISGAFWGLIAGGLMLALSRLV KIWKDRAQSR..

```

**FIGURA R.29.** Alineamiento de la secuencia de aa del Orf422 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 y de BenE de distintos organismos. El alineamiento se realizó con el programa Clustal W. En color rojo aparecen los aa conservados en al menos 3 de las secuencias, en azul los cambios conservativos, y en color gris se muestran los cambios no conservativos. AC, *Acinetobacter calcoaceticus*; PP, *Pseudomonas putida*; EC, *E. coli*; RL, *R. leguminosarum* bv. *viciae*.



desorganizada de los organismos de procedencia de las  $\square$ -IPM sintasas. Como se muestra en la Fig. R.30, excluida la secuencia de *A. fulgidus* por razones técnicas (enraizamiento del dendrograma), existen dos grandes grupos de  $\square$ -IPM sintasas y en ambos se incluyen tanto organismos eucariotas como procariontes. El grupo A se subdivide en 3 subgrupos: proteobacterias (Gram-negativas), plantas y cianobacterias, y firmibacterias (Gram-positivas). En el grupo B, aparecen dos subgrupos, levaduras por un lado, y por otro, un grupo que incluye entremezcladas bacterias Gram(+) y Gram(-). Las  $\square$ -IPM sintasas filogenéticamente más cercanas a las de *Rhizobium* son, como ya se había intuido del alineamiento de secuencias (Fig. R.8), las de *C. glutamicum* y *M. tuberculosis*. A la vista de estos resultados, parece claro que la filogenia de  $\square$ -IPM sintasas está en desacuerdo con las filogenias de los correspondientes organismos, hecho que puede explicarse por la existencia de procesos de transferencia genética horizontal. Aún cuando sería muy especulativa, la secuencia de transferencia horizontal de genes *leuA* en el caso que nos ocupa podría haber sido la siguiente: levaduras  $\longrightarrow$  Firmibacteria  $\longrightarrow$  Proteobacteria. Otra cuestión diferente es la de cuáles pueden haber sido las fuerzas selectivas de estos procesos de transferencia, puesto que es bastante probable que cada posible receptor tuviese previamente sus propios genes para la biosíntesis de leucina.

## 11- CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES LEUA<sup>-</sup> DE *R. LEGUMINOSARUM* BV. VICIAE.

Para comprobar sí los defectos simbióticos producidos por la delección de *leuA* en *S. meliloti* se mostraban también en cepas *leuA* de *R. leguminosarum* bv. viciae, se realizó una mutagénesis dirigida del gen *leuA* de esta bacteria, mediante inserción del gen de resistencia a Km en el sitio *Bgl* II presente en el gen *leuA*. La mutación resultante se muestra en la figura R.31. La idoneidad de la mutación en la cepa resultante, UPM791-01, fue comprobada mediante hibridación del ADN genómico de la cepa tanto frente a una sonda del gen *leuA*, como a una sonda correspondiente al gen de resistencia a Km introducido (Figs. R.32).

Se estudió el comportamiento en vida libre de la cepa *leuA* UPM791-01. Como cabía esperar, esta cepa era auxotrofa para leucina, y al igual que el mutante *leuA* de *S. meliloti*, crecía en medios suplementados con el intermediario metabólico  $\alpha$ -KIC, pero era

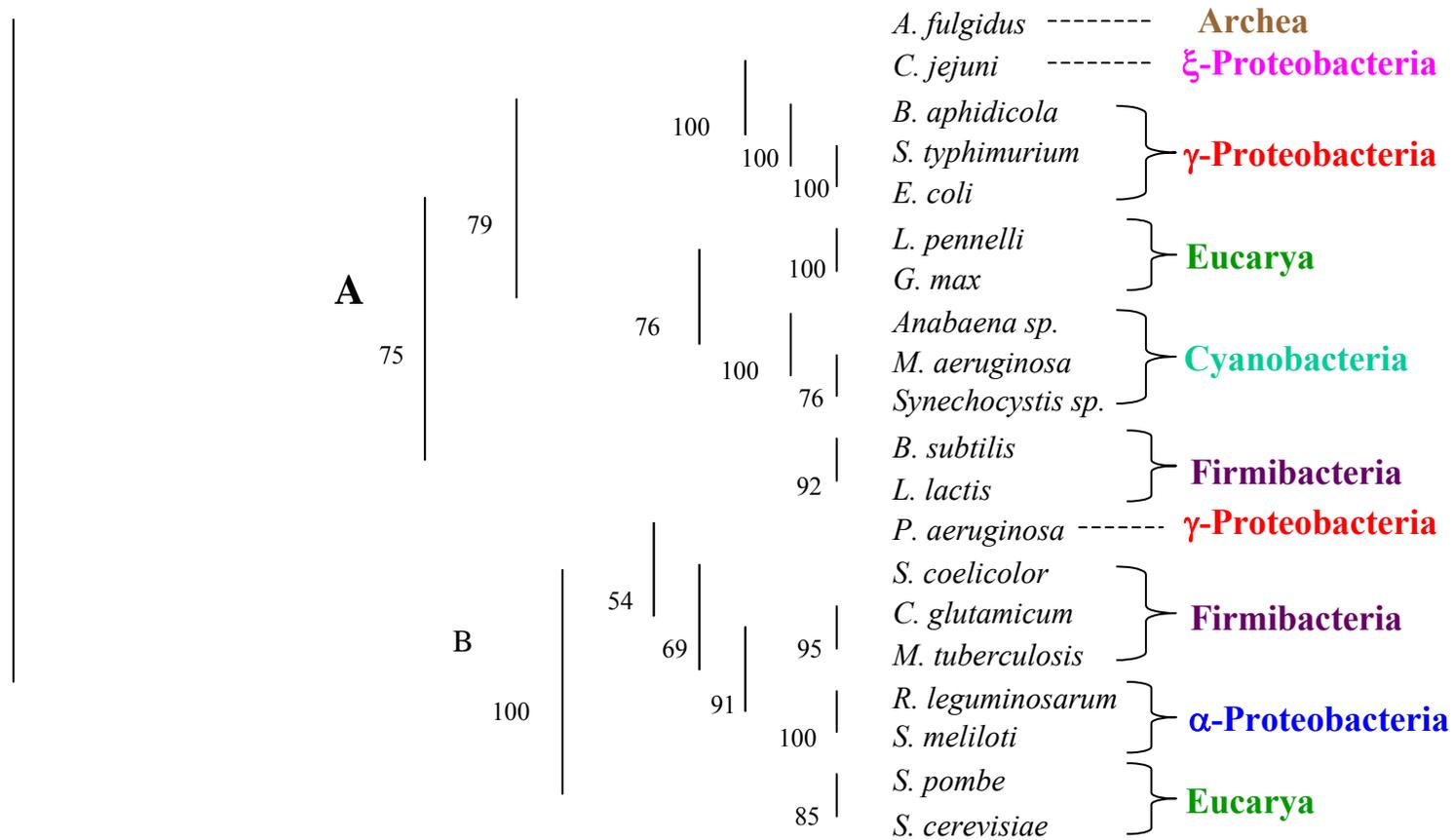
incapaz de crecer en medios suplementados con  $\alpha$ -KIV ó con  $\alpha$ -IPM. No se pudo determinar la actividad  $\square$ -IPM sintasa en las cepas de *R. leguminosarum*, pues ésta quedaba enmascarada por la existencia en los extractos celulares de alguna actividad enzimática formadora de CoA a partir de acetil-CoA, incluso en ausencia del sustrato  $\square$ -KIV (datos no mostrados). De todas formas, la cepa UPM791-01 recuperó la capacidad prototrófica cuando se le introdujo el plásmido pSm*leuA*, portador del gen *leuA* de *S. meliloti* GR4, lo que evidencia la ausencia de actividad  $\square$ -IPM sintasa en dicha cepa UPM791-01.

También se determinó la reversión de la cepa UPM791-01 a la prototrofia, a partir de cultivos celulares crecidos en TY, y que previamente lavados, fueron inoculados en placas carentes de leucina y antibióticos. La frecuencia de aparición de colonias prototrofas fue de  $1 \times 10^{-6}$ . Todas las colonias aparecidas fueron capaces de crecer en medios sin leucina, y además fueron sensibles al antibiótico kanamicina, lo que sugiere que la reversión del fenotipo se debe a excisión del interposón y regeneración del gen *leuA*.

## **12. FENOTIPO SIMBIÓTICO DE MUTANTES LEUA DE *R. LEGUMINOSARUM* BV. VICIAE.**

Se estudió el comportamiento del mutante UPM791-01 tras su inoculación sobre raíces de 2 plantas hospedadoras específicas, veza y guisante. Las plantas de veza fueron cultivadas en bolsas, y se siguió la nodulación diariamente durante tres semanas. Las plantas de guisante se cultivaron en jarras tipo Leonard durante 3 semanas y se cuantificaron los nódulos formados tras este tiempo. En ambos casos, las plantas fueron inoculadas con unas  $10^4$  células por planta, para evitar la aparición de revertientes. Cuando los inóculos contenían más de  $10^6$  células, todas las plantas formaron nódulos rosados, similares a los inducidos por la cepa silvestre. Se comprobó que las bacterias de estos nódulos no eran auxotrofas y habían perdido la resistencia a Km, lo que sugería que se trataba de revertientes prototrofos.

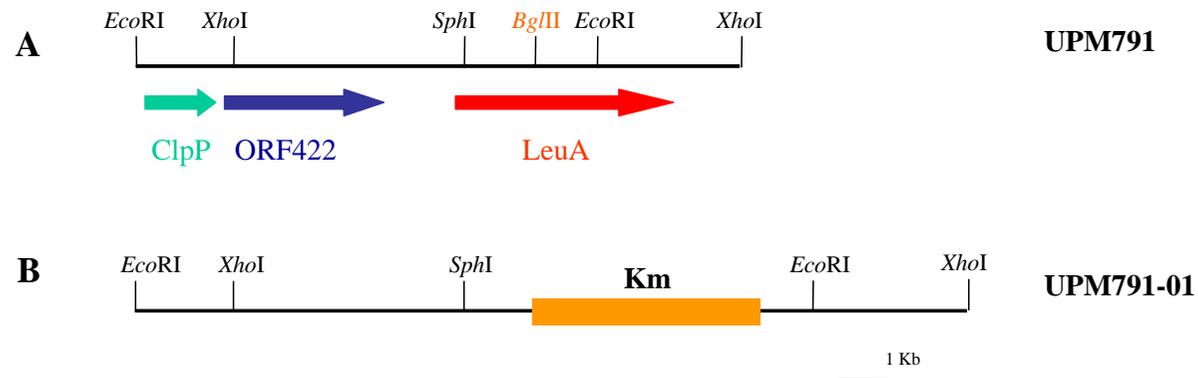
En ambas plantas hospedadoras, la cepa silvestre UPM791 formó nódulos fijadores de nitrógeno. En el caso de veza, estos nódulos eran visibles a partir del día 6 después de la inoculación. Por el contrario, la cepa UPM791-01 mostró un comportamiento algo variable en raíces de veza: mientras que la mitad de las plantas no formaron nódulos, el resto



**FIGURA R.30. Árbol filogenético de  $\alpha$ -IPM sintasas .** Las secuencias de  $\alpha$ -IPM sintasas de los 20 organismos indicados fueron sometidos a un alineamiento con el programa Clustal W. Este alineamiento fue procesado con el paquete de programas PHYLIPP hasta obtener el dendrograma expuesto. La secuencia de *A. fulgidus* fue utilizada como secuencia de “enraizamiento”. Los números delante de cada punto de bifurcación indican la fiabilidad (% probabilidad) de la misma.

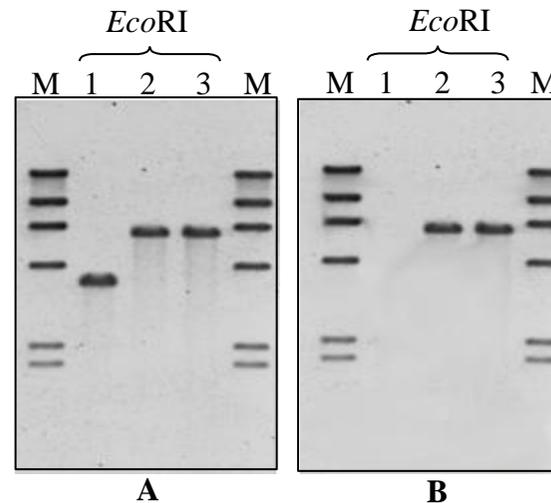


## Resultados



**FIGURA R.31. Organización genética de la región *leuA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791. A:** Mapa genético de la región *leuA*, indicando los marcos de lectura abiertos así como algunos sitios de restricción. **B:** Obtención de la cepa *leuA* UPM791-01 por inserción del gen de resistencia a Km en el sitio *BglIII* del gen *leuA*.

**FIGURA R.32. Hibridación de ADN de cepas *leuA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 con sonda pSPL1 (A) y sonda**



**pHP45Ω-Km (B).** 1) UPM 791; 2 y 3) Dos colonias tipo UPM791-01.



formaron tardíamente nódulos pequeños, blancos y aparentemente  $\text{Fix}^-$ . Estos nódulos aparecieron como abultamientos a partir del día 13 después de la inoculación. Al cabo de unos días desde su aparición, estos nódulos mostraron un color pardo, indicativo de su degeneración (Fig. R.33B). Este distinto comportamiento puede ser debido a diferencias entre las distintas plantas a nivel de la cantidad y calidad de los exudados producidos por cada planta individual. Como se ha visto en el caso de *S. meliloti*, la capacidad de nodulación de las cepas  $\text{LeuA}^-$  varía en función de la existencia de leucina ó precursores de leucina en la solución nutritiva vegetal.

En plantas de guisante, la cepa UPM791-01 fue incapaz de inducir la formación de nódulos al cabo de 3 semanas, fenotipo similar al mostrado por cepas *leuA* de *S. meliloti* en alfalfa (Fig. R.33A).

### **13. EXPRESION DE LOS GENES DE NODULACIÓN EN CEPAS $\text{LEUA}^-$ DE *R. LEGUMINOSARUM* BV. *VICIAE***

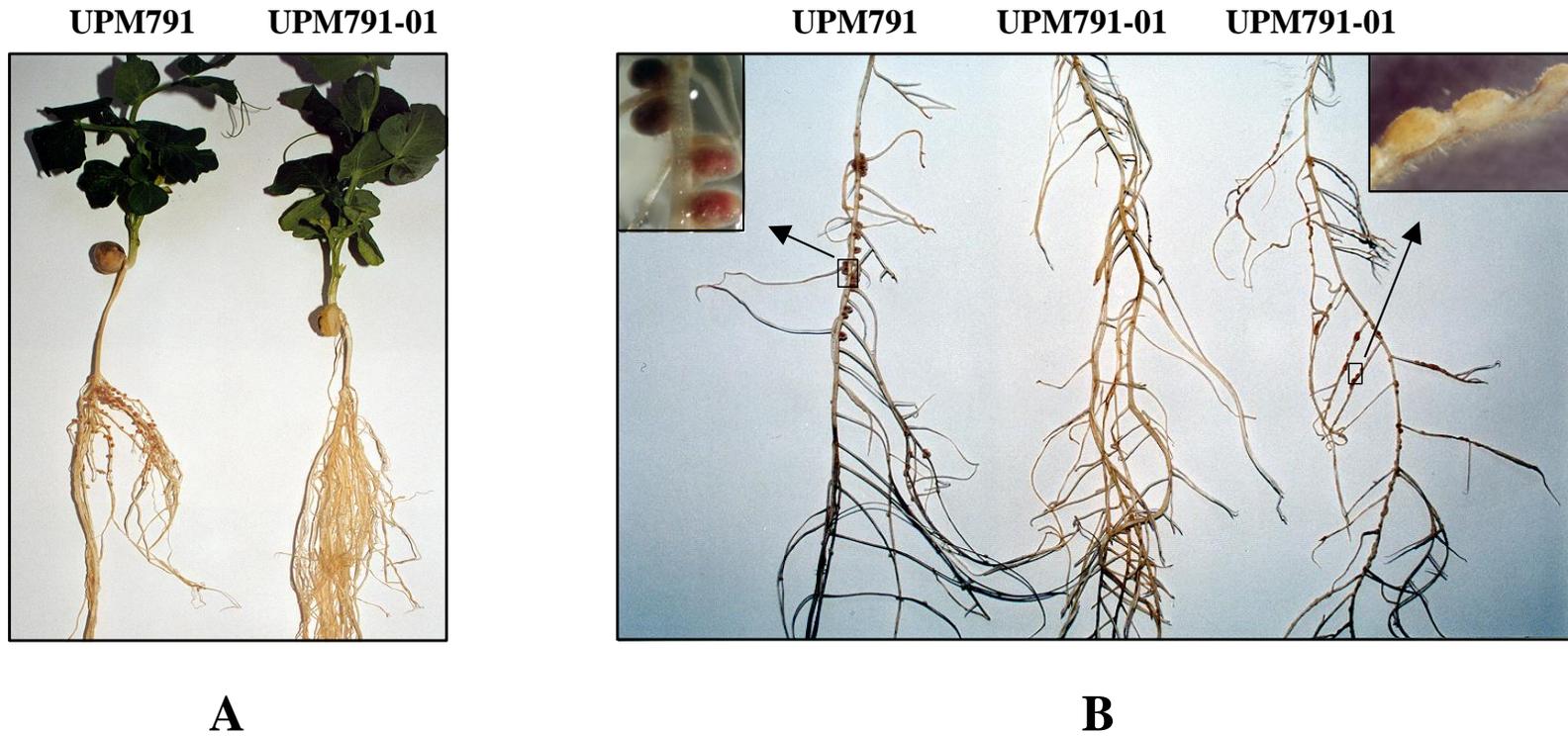
Para determinar sí las cepas  $\text{LeuA}^-$  de *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 eran capaces de inducir correctamente los genes de nodulación, se comparó la expresión de fusiones *nodA-lacZ* (dependiente de flavonoides) y *nodD-lacZ* (independiente de flavonoides) en la cepa  $\text{LeuA}^-$  UPM791-01 y en la cepa silvestre UPM791. La actividad  $\beta$ -galactosidasa fue determinada en presencia ó ausencia de naringenina, el principal inductor de los genes *nod* en *R. leguminosarum* bv. *viciae*, tanto en medio rico (YGT), como en medio mínimo (MM). No se encontraron diferencias significativas entre la cepa parental y el mutante *leuA* en cuanto a la expresión de las fusiones *nodA-lacZ* (Fig. R.34) y *nodD-lacZ* (Fig. R.35), tanto en medio YGT como en MM suplementado con leucina ó  $\alpha$ -KIC 200  $\mu\text{M}$ . Estos resultados sugerían que en las cepas *leuA* de *R. leguminosarum* la expresión de genes *nod* no se encuentra significativamente alterada. No obstante, los ensayos de expresión fueron realizados en medios que contenían leucina o  $\alpha$ -KIC, necesarios para el crecimiento de estos mutantes, por lo que cabía la posibilidad de que estos compuestos estuviesen enmascarando, como se había observado en *S. meliloti*, el comportamiento de las cepas *leuA* con respecto a la inducción de genes *nod* por flavonoides.

Cuando se ensayó la inducción por naringenina de la fusión *nodA-lacZ* en MM sin fuente de nitrógeno combinado, o suplementado con 200  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -KIV, ó  $\alpha$ -IPM, ésta se

redujo de 8 a 10 veces con respecto a la cepa silvestre, mientras que se expresó a niveles similares en ambas cepas, silvestre y mutante, en MM adicionado de 200  $\mu$ M de  $\alpha$ -KIC ó de leucina (Fig. R.36). Esto indicaba que, a diferencia de la cepa silvestre, la cepa *LeuA*<sup>-</sup> UPM791-01 tiene alterada la capacidad para inducir los genes de nodulación en respuesta a naringenina, y que esta alteración se ve aliviada por la presencia de leucina ó  $\alpha$ -KIC en el medio. Aún cuando la recuperación de la inducción de *nodA* por leucina pudiera deberse a que este compuesto alivia la limitación de nitrógeno impuesta, el rescate en presencia de  $\alpha$ -KIC exógeno no puede atribuirse a tal alivio nutritivo, dado que este compuesto no aporta nitrógeno a las células.

Por el contrario, la expresión de la fusión *nodD-lacZ* en medios carentes de nitrógeno combinado fue similar en el mutante *LeuA*<sup>-</sup> y en la cepa silvestre UPM791, independientemente de la presencia o no de leucina o sus precursores en el medio (Fig. R.37). En medio con naringenina y en ausencia de nitrógeno, la expresión de *nodD* en la cepa *leuA* fue algo superior a la cepa silvestre, situación que podría estar relacionada con la conocida autorregulación negativa de *nodD* en esta bacteria (Rossen *et al.*, 1985).

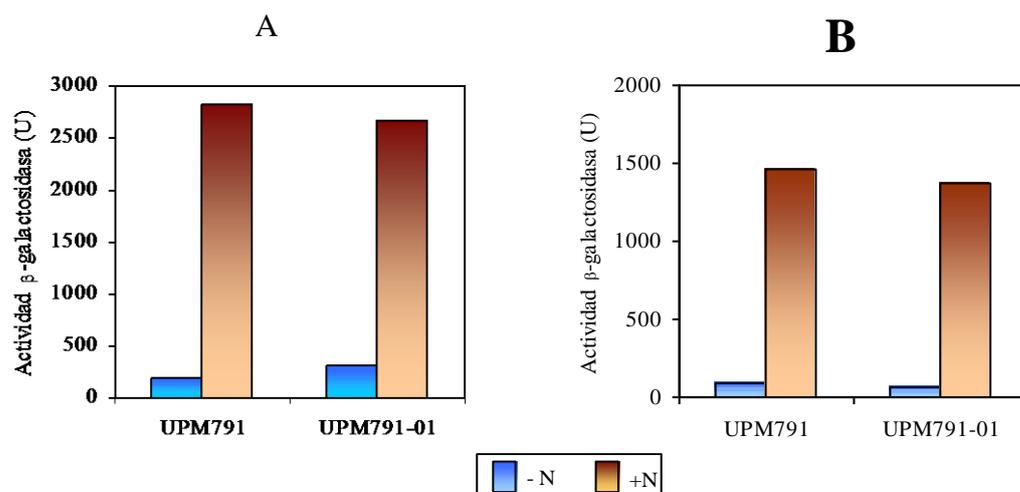
Estos resultados indicaban, al igual que en *S. meliloti*, que las cepas *leuA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* son incapaces de nodular a sus plantas hospedadoras debido a dos efectos de la mutación: la auxotrofia para leucina, que limita su crecimiento en la rizosfera, y una alteración de la inducción de genes *nod*, mediada por NodD en respuesta a naringenina. Los datos indicaban, además, que ambos fenotipos pueden ser rescatados por la leucina o por  $\alpha$ -KIC exógenos.



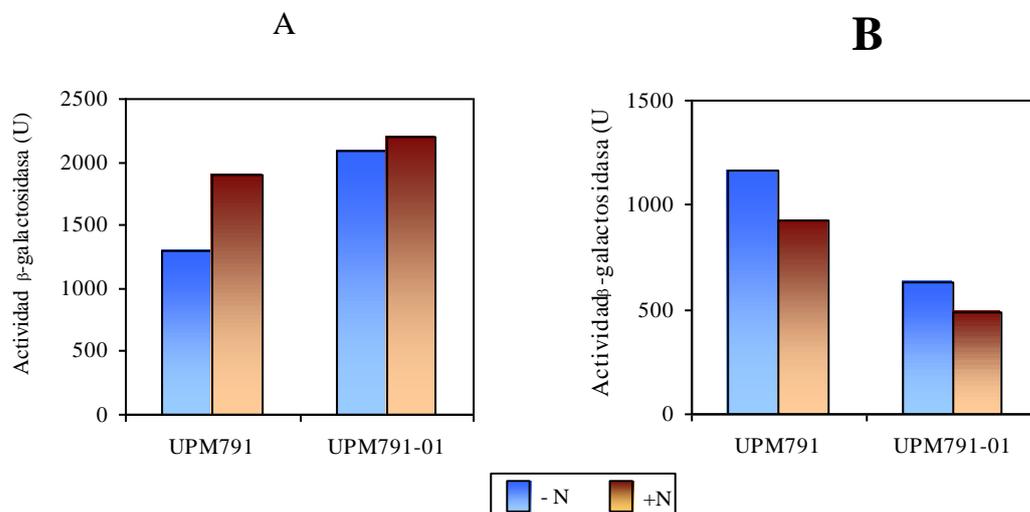
**FIGURA R.33. Fenotipo simbiótico de cepas *leuA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Plantas de guisante (A) y veza (B) 3 semanas después de su inoculación con la cepa silvestre UPM791 o la cepa *leuA* UPM791-01.**

## Resultados

---



**FIGURA R.34.** Expresión de *nodA* en *R. leguminosarum* bv viciae UPM791 y en la cepa *leuA* UPM791-01. La actividad  $\beta$ -galactosidasa (Unidades Miller) fue determinada en medio YGT (A) y en medio mínimo suplementado con leucina 200  $\mu$ M (B), en ausencia (-N) o en presencia de naringenina 400 nM (+N).



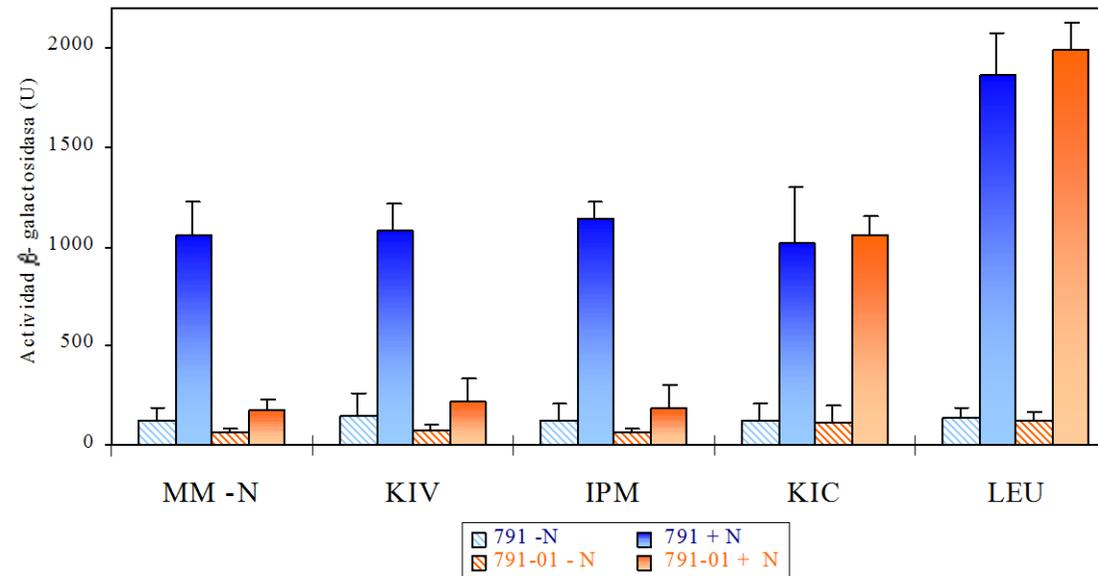
**FIGURA R.35.** Expresión de *nodD* en *R. leguminosarum* bv viciae UPM791 y en la cepa *leuA* UPM791-01. La actividad  $\beta$ -galactosidasa (Unidades Miller) fue determinada en medio YGT (A) y en medio mínimo suplementado con leucina 200  $\mu$ M (B), en ausencia (-N) o en presencia de naringenina 400 nM (+N).



## Resultados

Medio de cultivo	Actividad $\beta$ -galactosidasa*			
	UPM 791		UPM 791-01	
	- N	+ N	- N	+ N
MM-Nitrog.	121.34 $\pm$ 65	1062.51 $\pm$ 163	61.22 $\pm$ 24	173.11 $\pm$ 60
MM+ KIV	147.75 $\pm$ 11	1075.74 $\pm$ 139	71.90 $\pm$ 30	221.41 $\pm$ 115
MM+ IPM	125.42 $\pm$ 82	1138.39 $\pm$ 92	57.76 $\pm$ 23	188.02 $\pm$ 112
MM+ KIC	129.32 $\pm$ 82	1014.41 $\pm$ 282	118.38 $\pm$ 77	1055.13 $\pm$ 36
MM+ LEU	136.12 $\pm$ 57	1688.13 $\pm$ 208	128.97 $\pm$ 36	1987.62 $\pm$ 137

\* Unidades Miller



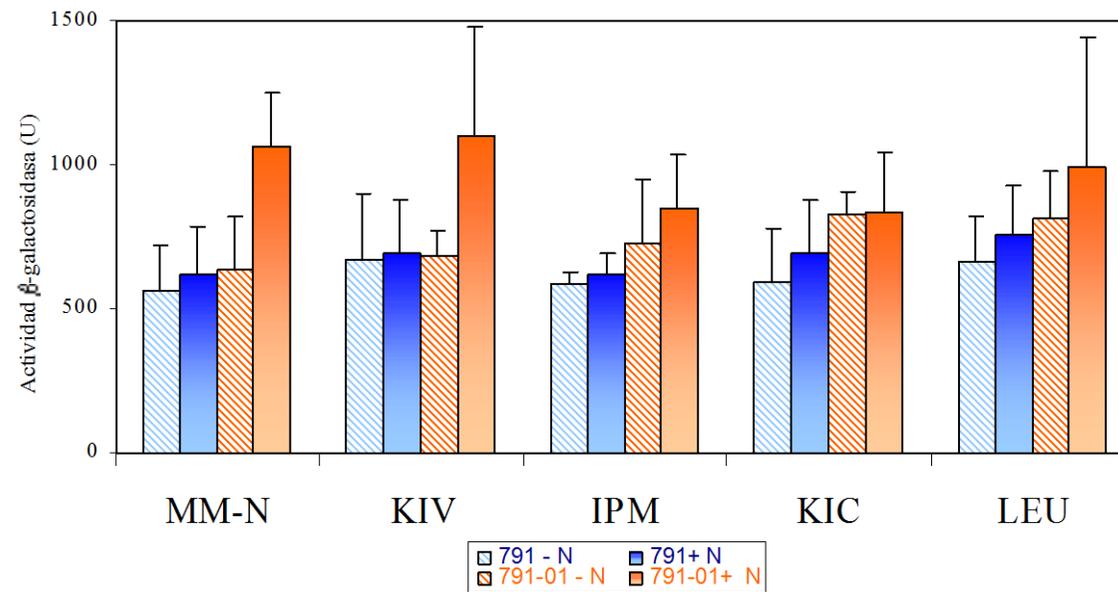
**FIGURA R.36.** Expresión de la fusión *nodA-lacZ* (pMP154) en la cepa silvestre UPM791 y en la cepa *leuA* UPM791-01 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* en MM sin fuente de nitrógeno fijado. La actividad  $\beta$ -galactosidasa (Unidades Miller) fue determinada en bacterias crecidas durante 8 horas en un medio mínimo sin fuente de nitrógeno (MM- N) suplementado con 200  $\mu$ M de  $\alpha$ -cetoisovalerato (KIV),  $\alpha$ -isopropilmalato (IPM),  $\alpha$ -cetoisocaproato (KIC) o L-leucine (LEU), en presencia (+N) o ausencia (-N) de naringenina 400 nM. Los datos son la media de 3 experimentos.  $\pm$  Desviación estandar.



## Resultados

Medio de cultivo	Actividad $\beta$ -galactosidasa*			
	UPM 791		UPM 791-01	
	- N	+ N	- N	+ N
MM -Nitrog	565.51 $\pm$ 159	624.75 $\pm$ 163	635.08 $\pm$ 185	1066.59 $\pm$ 186
MM + KIV	672.51 $\pm$ 226	693.93 $\pm$ 182	668.73 $\pm$ 79	1099.41 $\pm$ 82
MM + IPM	586.41 $\pm$ 45	624.53 $\pm$ 70	726.94 $\pm$ 226	847.97 $\pm$ 188
MM + KIC	590.94 $\pm$ 191	690.67 $\pm$ 184	828.53 $\pm$ 77	834.01 $\pm$ 208
MM + LEU	663.65 $\pm$ 157	758.05 $\pm$ 170	816.63 $\pm$ 163	992.08 $\pm$ 447

\* Unidades Miller



**FIGURA R.37.** Expresión de la fusión *nodD-lacZ* (pMP154) en la cepa silvestre UPM791 y en la cepa *leuA* UPM791-01 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* en MM sin fuente de nitrógeno fijado. La actividad  $\beta$ -galactosidasa (Unidades Miller) fue determinada en bacterias crecidas durante 8 horas en un medio mínimo sin fuente de nitrógeno (MM- N) suplementado con 200  $\mu$ M de  $\alpha$ -cetoisovalerato (KIV),  $\alpha$ -isopropilmalato (IPM),  $\alpha$ -cetoisocaproato (KIC) o L-leucine (LEU), en presencia (+N) o ausencia (-N) de naringenina 400 nM. Los datos son la media de 3 experimentos  $\pm$  desviación estandar.



#### 14. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *LEUA* EN *RHIZOBIUM*

En enterobacterias, la expresión de los genes que codifican para las enzimas que participan en la biosíntesis de leucina suele estar regulada negativamente por los niveles de leucina intracelular, mediante mecanismos de atenuación de la transcripción. En el caso de *E. coli* y *S. typhimurium* los genes *leuABCD* se agrupan en un único operón, lo que facilita el control simultáneo de todos ellos. En este operón funciona un mecanismo de atenuación de la transcripción de tipo I (Landick *et al.*, 1996), caracterizado por la existencia de varias estructuras en el segmento de ARNm anterior al de los genes estructurales (ARNm líder): sitios de pausa de la transcripción y terminadores independientes de Rho, una región codificante para un corto péptido líder que contiene varios codones para el aminoácido regulador, y segmentos del transcrito con potencialidad para formar estructuras secundarias. En el caso del operón *leu* de *E. coli*, el péptido líder contiene 4 codones contiguos para leucina del tipo CUA, codones de uso poco común. La atenuación está mediada por la velocidad a la que el ribosoma puede moverse a través de los 4 codones de leucina, lo que determina la formación de estructuras secundarias en el ARN de tipo terminador o antiterminador, causando la terminación de la transcripción o su continuación a través de los genes estructurales, respectivamente. La disponibilidad de leucina-ARNt cargados influye directamente en la síntesis del péptido líder y por tanto en la velocidad de traducción del ARNm líder. No obstante, podría no ser éste el único mecanismo de regulación por leucina, puesto que la eliminación o reemplazamiento de los 4 codones CUA del péptido líder no conlleva la completa eliminación del control por leucina ( Umbarger, 1996).

En el caso de *S. meliloti* y *R. leguminosarum*, al menos el gen *leuA* se encuentra desligado del resto de genes *leu*, por lo que es posible que los distintos genes implicados en la biosíntesis de leucina estén sujetos a diferentes mecanismos de regulación.

El análisis de las secuencias (324 nt) inmediatamente corriente arriba de la región codificante para *leuA* en ambas especies de rizobios mostró que muestran un nivel de conservación inferior (60%) al existente entre las secuencias codificantes (80%). No obstante, en dichos fragmentos de 324 nt, existe un segmento en que ambas secuencias están muy conservadas, segmento que incluye parte de la región codificante para un posible péptido de 41 aa, que en ambas especies contiene 5 codones para leucina, 4 de ellos

contiguos (Fig. R.38). Un inconveniente para que tal secuencia sea traducida es que no existe una buena secuencia para unión de ribosomas adyacente a la misma. En ambas especies también se pudo identificar una secuencia con potencialidad para formar una estructura en tallo y vuelta (“stem-loop”, Fig. R.38). No se ha investigado en este trabajo la funcionalidad de estas secuencias, ni se ha determinado el sitio de inicio de la transcripción en estos genes.

Se estudió si la expresión de los genes *leuA* de *Rhizobium* también puede estar regulada por leucina, al igual que en enterobacterias. Para ello se procedió a la construcción de fusiones con genes informadores. En el caso de *leuA* de *S. meliloti*, se construyó una fusión transcripcional a *lacZ*, utilizando el vector pMP220, tal y como se detalla en la Fig. R.39. También se construyó una fusión traduccional a *gusA*, el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (Fig. R.40). La fusión resultante fue clonada en el vector pJB3Tc19, plásmido que puede replicarse en *Rhizobium*. En el caso de *leuA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791, se construyó también una fusión de tipo traduccional al gen *gusA*. El plásmido resultante, pSPLG, también está basado en el vector pJB3Tc19 (Fig. R. 41).

La expresión de las distintas fusiones fue estudiada, tanto en las cepas silvestres como en mutantes *leuA*, en células cultivadas en MM carente de glutamato sódico y suplementado con  $\text{CINH}_4$  2mM y cantidades variables de leucina (entre 0 y 100 mM) durante 16 horas. Como se observa en la figura R.42, la fusión *leuA-lacZ* en *S. meliloti* se expresó de manera independiente a la concentración de leucina exógena, tanto en la cepa silvestre como en la cepa  $\text{LeuA}^-$ . Una situación parecida se dio también en el caso de la fusión *leuA-gusA* (Fig. R.43), si bien la actividad  $\beta$ -glucuronidasa expresada por la cepa  $\text{LeuA}^-$  se incrementó lentamente conforme aumentaba la concentración de leucina en el medio. En cuanto a la expresión de *leuA* de *R. leguminosarum*, la expresión de la fusión traduccional *leuA-gusA* en la cepa silvestre fue similar en todas las condiciones, e independiente de la presencia de leucina en el medio (Fig. R.44). Por el contrario, en la cepa *leuA* UPM791-01, los niveles de expresión aumentaron gradualmente conforme aumentaba la concentración de leucina en el medio (Fig. R.44). Estos mismos ensayos fueron realizados en MM suplementado con diferentes concentraciones de leucina como única fuente de nitrógeno, obteniéndose resultados similares a los expuestos anteriormente

**A**

```

SmupsLeuA      -----TCTTGCTCCGCTTTACCAAGCCGTG-TATAGGCTTTT-TATGACTCAGGCTGAC 52
RlupsLeuA      CCAAGGACTTGC-CAGCTTTACCGTCCGAGGCTATAAGCGCGGGCATGAAGACCACTGGC 59
                ***** * ***** * * **** * *      ****      *** *

SmupsLeuA      GCACACAAGATCGCAGCGATCTCTTCCGGACACGATGCCAATCGTGCTCCTGCGCGCGCC 112
RlupsLeuA      GCCAGAATTTCTGACACGATTACACGCGGCCGCATCGCCTGCGTGACAATACGCGCGCC 119
                **      *      *      ***** *      *** * *      ***      ****      * *****

SmupsLeuA      ACCGCATCCCTTCTTCTTCTCGGCCTTATCCGCGGTTGCCGGGTTGCGCTGAGGAGCGCCC 172
RlupsLeuA      CTGACCTCGCTTCTTCTCCTCGGCCTTACGCGCGGTTGCCGGGTCCTTTGAGGAGCGCCC 179
                * * * ***** ***** ***** ***** * *****

SmupsLeuA      GGCGGCCGAAAAGCCTTGCCGGCACCTGCTCCTCGAAATCCAGA---AAAGCTGAACCAA 229
RlupsLeuA      GGCGGCCGAAA-GCCCGCCCGGCCATCGCTCCTCGCGACTCACTTTCAAAAATTGACCTAA 238
                ***** ***** * * * * *      *** * * *

SmupsLeuA      ATCGCG-CGGCCCCGCGGCATCGCCATCGCAATGTCCCGAATGATCGGCTATTGCATGC 288
RlupsLeuA      CGACCGACAAGTCCGCA-TTTGTTTATCGCCAAGCCGACGTGATCGGCTA-----AG 291
                * * *      **** *      ***** * * * * *      *****

SmupsLeuA      GGCAGGCTACGCTCAAGTGACGAAGAGAAGCTGCAC 324
RlupsLeuA      AGCGGGCAAATGCCGG--GACGAGGAGACGATACG- 324
                ** *** *      *      ***** ***** * * *
    
```

**B**

```

SmupsLeuA
ATGACTCAGGCTGACGCACACAAGATCGCAGCGATCTCTTCCGGACACGATGCCAATCGTGCTCCTGCGCGCGCC
RlupsLeuA
ATGAAGACCACTGGCGCCAGAATTTCTGACACGATTACACGCGGCCGCATCGCCTGCGTGACAATACGCGCGCC

                <-----> <----->

SmupsLeuA
ACCGCATCCCTTCTTCTTCTCGGCCTTATCCGCGGTTGCCGGGTTGCGCTGAGGAGCGCCCGCGCCGAAA
RlupsLeuA
CTGACCTCGCTTCTTCTCCTCGGCCTTACGCGCGGTTGCCGGGTCCTTTGAGGAGCGCCCGCGCCGAAA
    
```

**C**

```

Sm lead pep  MTQDAHKIAAIISSGHDANRAPARATASLLLLGLIRGCRVR
Rl lead pep  MKTTGARISDTITRGRIALRDNTRALTSLLLLGLTRGCRVL
                *. :.*:   :*: * : * * :** :***** *****
    
```

**FIGURA R.38. A) Alineamiento de las secuencias de nucleótidos en la región inmediatamente adjacente (corriente arriba) a la zona codificante para *leuA* en *S. meliloti* o *R. leguminosarum*. En color rojo se indica la región que podría codificar para un péptido líder. B) Identificación de secuencias con posibilidad de formar estructuras secundarias en el ARN. C) Comparación de las secuencias de aa deducidos para los posibles péptidos líder en ambos genes *leuA*. En color azul se destacan las 4 leucinas contiguas en ambos péptidos.**



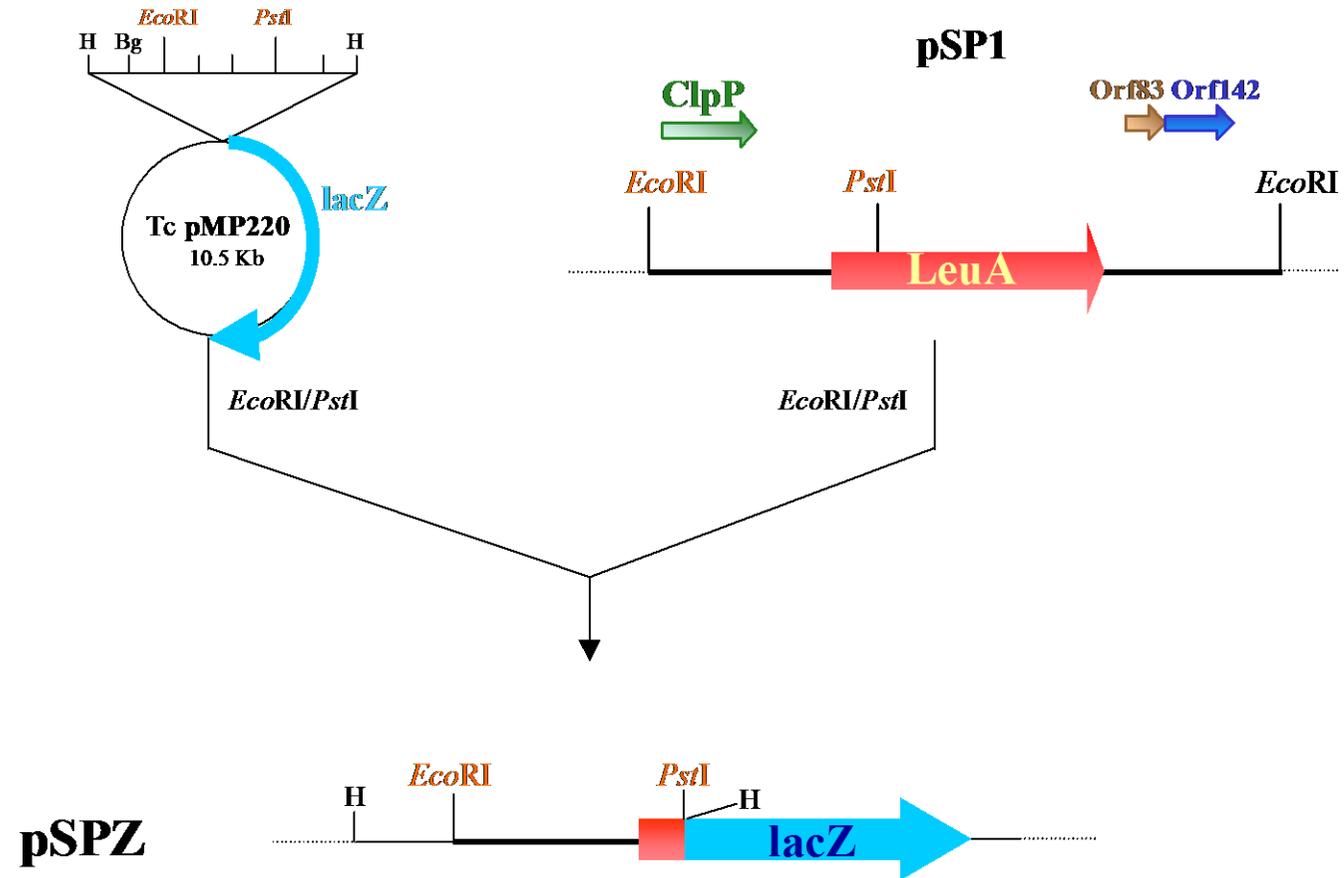


FIGURA R.39. Construcción de la fusión transcripcional de *leuA* de *S. meliloti* a *lacZ*.



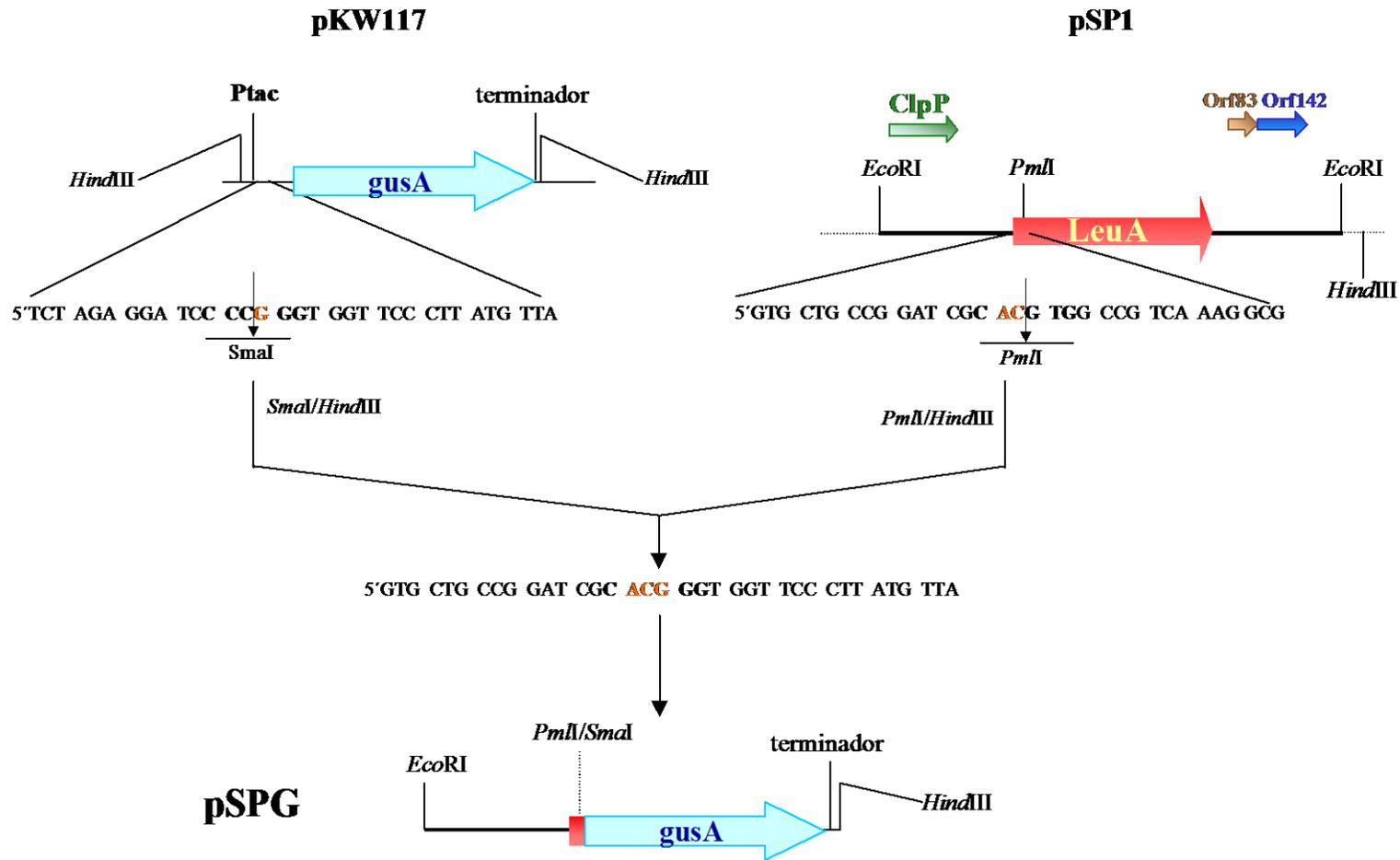


FIGURA R.40. Construcción de la fusión traduccional de *leuA* de *S. meliloti* a *gusA*.



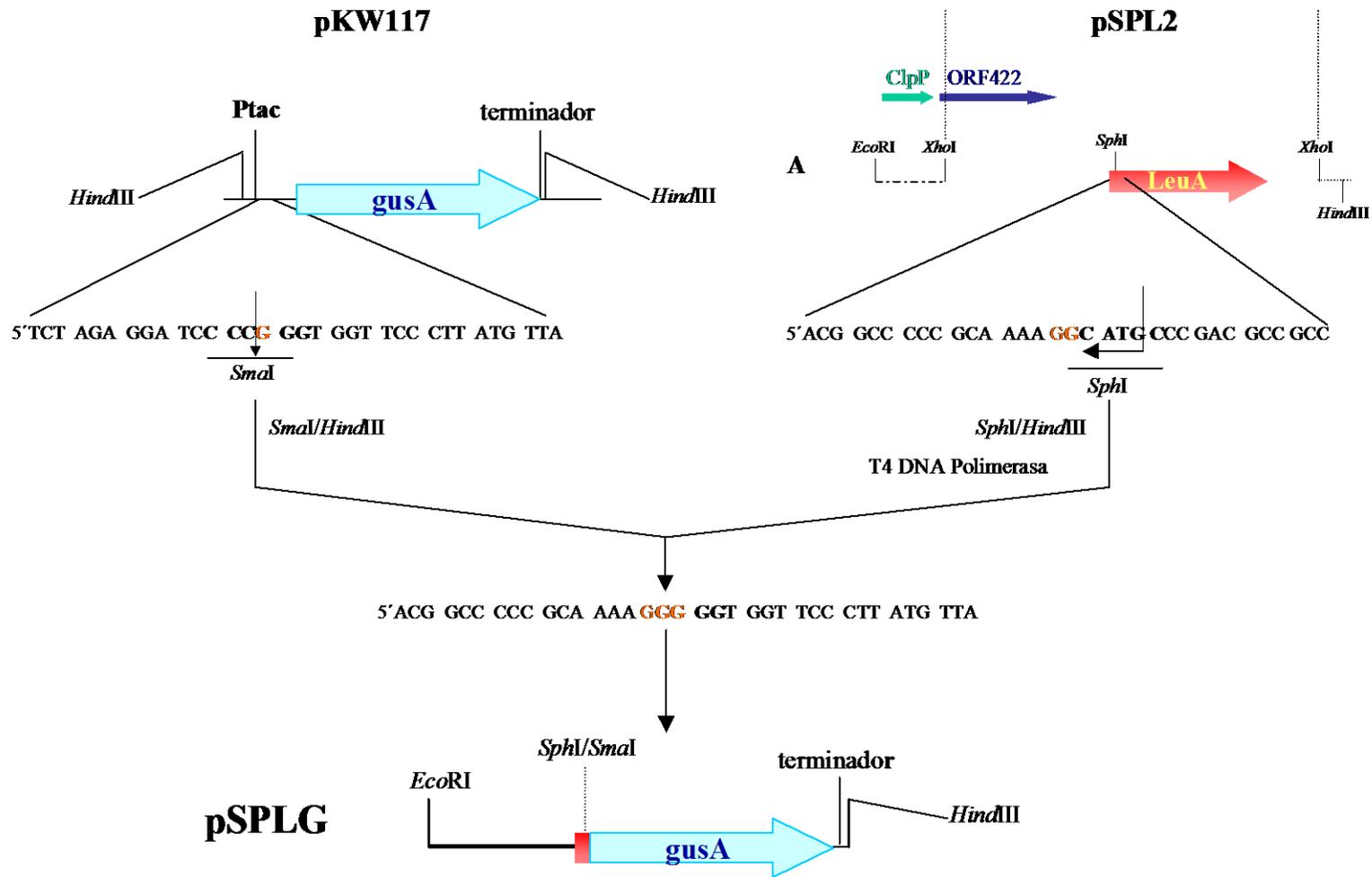


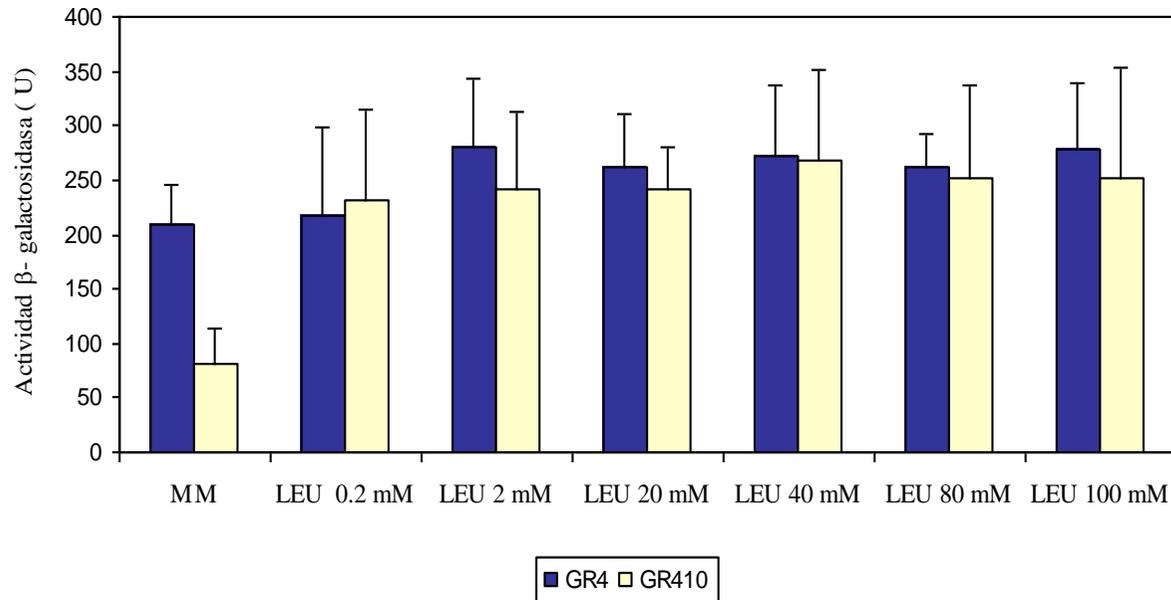
FIGURA R.41. Construcción de la fusión traduccional de *leuA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* a *gusA*.



## Resultados

Medio de cultivo	Actividad $\beta$ -galactosidasa *	
	R.m. GR4	R.m. GR410
MM	208.60 $\pm$ 38	82.03 $\pm$ 31
MM + LEU 0.2 mM	217.23 $\pm$ 82	231.92 $\pm$ 82
MM + LEU 2mM	280.27 $\pm$ 63	240.74 $\pm$ 71
MM + LEU 20 mM	260.95 $\pm$ 49	240.71 $\pm$ 39
MM + LEU 40 mM	272.31 $\pm$ 65	268.17 $\pm$ 82
MM + LEU 80 mM	261.16 $\pm$ 31	251.96 $\pm$ 85
MM + LEU 100 mM	277.63 $\pm$ 62	252.29 $\pm$ 101

\* Unidades Miller

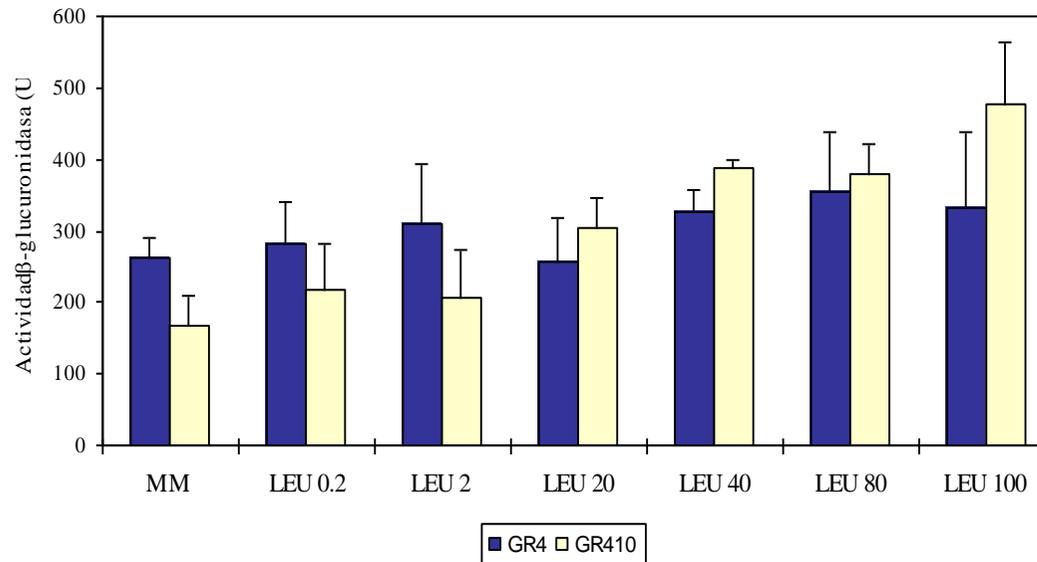


**FIGURA R.42. Expresión de la fusión *leuA-lacZ* en la cepa silvestre GR4 y la cepa *leuA* GR410 de *S. meliloti*.** La actividad  $\beta$ -galactosidasa (Unidades Miller) fue determinada en medio mínimo con  $\text{CINH}_4$  2mM (MM) suplementado con distintas concentraciones de L-leucina (0 mM, 0.2mM, 2mM, 20mM, 40mM, 80mM y 100mM). Los datos son la media de 3 experimentos  $\pm$  Desviación estandar.



## Resultados

Medio de cultivo	Actividad $\beta$ -glucuronidasa*	
	R.m. GR4	R.m. GR410
MM	263.50 $\pm$ 27	167.42 $\pm$ 42
MM + LEU 0.2 mM	281.24 $\pm$ 60	216.43 $\pm$ 67
MM + LEU 2 mM	310.17 $\pm$ 63	206.03 $\pm$ 66
MM + LEU 20 mM	256.75 $\pm$ 60	305.39 $\pm$ 42
MM + LEU 40 mM	325.16 $\pm$ 32	387.69 $\pm$ 11
* Unidades Miller	42 $\pm$ 85	380.90 $\pm$ 40
	.00 $\pm$ 105	478.54 $\pm$ 85



**FIGURA R.43. Expresión de la fusión *leuA-gusA* en la cepa silvestre GR4 y la cepa *leuA* GR410 de *S. meliloti*.** La actividad  $\beta$ -glucuronidasa (Unidades Miller) fue determinada en medio mínimo con  $\text{CINH}_4$  2mM (MM) suplementado con distintas concentraciones de L-leucina (0mM, 0.2mM, 2mM, 20mM, 40mM, 80mM y 100mM). Los datos son media de 3 experimentos  $\pm$  Desviación estandar.

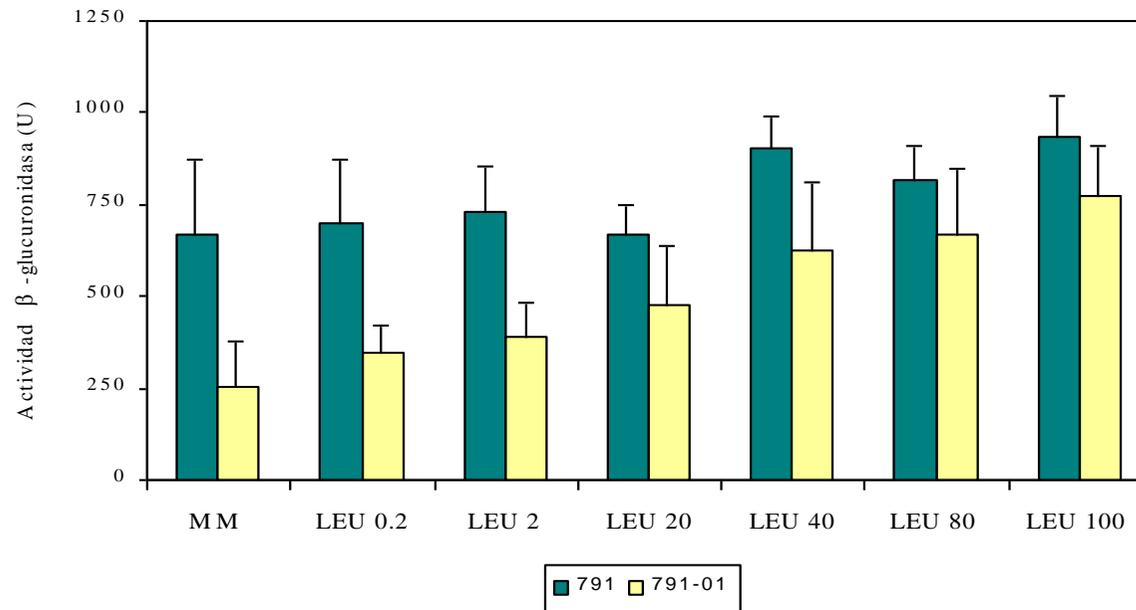
## Resultados

---

## Resultados

Medio de cultivo	Actividad $\beta$ -glucuronidasa *	
	R.m. GR4	R.m. GR410
MM	671.25 $\pm$ 199	255.24 $\pm$ 120
MM + LEU 0.2 mM	699.62 $\pm$ 175	344.00 $\pm$ 76
MM + LEU 2mM	728.61 $\pm$ 128	387.14 $\pm$ 96
MM + LEU 20 mM	670.04 $\pm$ 77	477.03 $\pm$ 161
MM + LEU 40 mM	901.58 $\pm$ 86	623.58 $\pm$ 189
MM + LEU 80 mM	818.96 $\pm$ 92	668.28 $\pm$ 179
MM + LEU 100 mM	936.41 $\pm$ 106	773.92 $\pm$ 137

\* Unidades Miller



**FIGURA R.44.** Expresión de la fusión *leuA-gusA* en la cepa silvestre actividad  $\beta$ -glucuronidasa (Unidades Miller) fue determinada en medio mínimo (0mM, 0.2mM, 2mM, 20mM, 40mM, 80mM y 100mM). Los datos son la media

UPM791 y la cepa *leuA* UPM791-01 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. La actividad  $\beta$ -glucuronidasa (Unidades Miller) fue determinada en medio mínimo (0mM, 0.2mM, 2mM, 20mM, 40mM, 80mM y 100mM) suplementado con distintas concentraciones de L-leucina con  $\text{CINH}_4$  2mM (MM) suplementado con distintas concentraciones de L-leucina de 3 experimentos  $\pm$  desviación estándar.



(datos no presentados). Estos resultados indicaban que no existe una aparente regulación de los genes *leuA* de *Rhizobium* por leucina. No obstante, los resultados han de tomarse con cierta cautela, por varias razones: la expresión ha sido determinada en fusiones portadas en plásmidos, con un número de copias relativamente elevado (10-15), lo que podría resultar en un patrón de expresión diferente al que pueda ocurrir en el gen en monocopia y en su localización genómica; además, si bien es cierto que los niveles de leucina intracelular dependen de la capacidad de biosíntesis de la misma (eliminada en el caso de los mutantes *leuA*), y de la cantidad de leucina presente en el medio de cultivo, también ha de considerarse, particularmente en el caso de mutantes *leuA*, que no tiene por qué existir una relación directa entre la concentración de leucina intracelular y la concentración del aminoácido en el medio, dado que se desconoce la cinética de su transporte. En cualquier caso, y con las construcciones empleadas, la leucina exógena no parecía influir negativamente en la expresión de estos genes, cosa que sí ocurre en el caso de enterobacterias (Umbarger, 1996).

También se ha llevado a cabo un estudio preliminar de la expresión de estos genes *leuA* en simbiosis. Las cepas silvestres *S. meliloti* GR4 y *R. leguminosarum* UPM791 portadoras de las correspondientes fusiones *leuA-gusA*, fueron inoculadas en alfalfa y guisante, respetivamente. Los nódulos formados tras 3 semanas, fueron incubados en presencia del sustrato X-gluc durante 16 horas. En ambos casos, los nódulos mostraron tinción de color verde-azulada, indicativo de la expresión de *leuA* en el interior del nódulo (resultados no presentados). No obstante, no se ha podido determinar si esta tinción se debe a la expresión de *leuA* en todas las zonas del nódulo, o si por el contrario la expresión podría estar limitada a zonas concretas.

## DISCUSIÓN

---

Muchos de los estudios genéticos iniciales en *Rhizobium* fueron dirigidos al aislamiento de mutantes auxotrofos para distintos compuestos nutritivos (aminoácidos, vitaminas, etc.), con dos objetivos fundamentales: la construcción de los primeros mapas genéticos de estas bacterias (Casadesús *et al.*, 1979) y la determinación de la importancia de las correspondientes rutas biosintéticas para el establecimiento de la simbiosis (Dénarié *et al.*, 1976). Con la llegada de la genética molecular, y la caracterización de los genes simbióticos, directamente implicados en el establecimiento de la simbiosis, los estudios sobre auxotrofias en *Rhizobium* fueron prácticamente abandonados. Muchos de los auxotrofos descritos mostraban deficiencias simbióticas, generalmente menores eficiencias de nodulación o la formación de nódulos no fijadores de nitrógeno. En muchos casos la adición al medio del compuesto (aa, vitamina, etc.) correspondiente revertía los efectos de la mutación sobre la simbiosis. Lo más fácil en estos casos era concluir que las deficiencias simbióticas observadas se debían exclusivamente a la incapacidad de la cepa auxotrofa para crecer en ausencia del aminoácido o vitamina, si ésta no era proporcionada por la planta a través de sus exudados o dentro del nódulo (Niner y Hirsch, 1998).

Sólo un par de estudios previos han descrito el fenotipo simbiótico de cepas Leu<sup>-</sup> de *Rhizobium* (Truchet *et al.*, 1980; George y Robert, 1991). Tanto en el caso de *S. meliloti* como de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, las cepas Leu<sup>-</sup> descritas formaban nódulos en sus respectivas plantas hospedadoras, si bien de manera poco eficiente y retrasada. Estos nódulos eran vacíos o contenían pocas bacterias. El caso mejor estudiado fue el de *S. meliloti*, en que Truchet y colaboradores (1980) mostraron que cepas Leu<sup>-</sup> formaban nódulos en alfalfa en los que el tejido central no estaba diferenciado, si bien se observó la existencia de un meristemo y de una vasculatura periférica típica de los nódulos de alfalfa. En estos nódulos los cordones de infección no se desarrollaban, y las bacterias quedaban atrapadas en ellos.

La adición de leucina al medio de la planta hacía que los canales de infección se elongasen, y ocurriese la endocitosis bacteriana por las células vegetales y su diferenciación posterior en bacteroides fijadores de nitrógeno (Truchet *et al.*, 1980). Se concluía así que las deficiencias simbióticas provocadas por la mutación se debían exclusivamente a la incapacidad de la bacteria para crecer en ausencia de leucina. Sin embargo, la formación de nódulos fijadores también se restauraba cuando al medio nutritivo de la planta se añadía  $\square$ -KIV, un intermediario metabólico de la leucina que, sin

embargo, no era capaz de restaurar el crecimiento en vida libre de las cepas  $Leu^-$ . Para explicar esta discordancia, Truchet y col. (1980) sugirieron que en presencia de  $\square$ -KIV la planta podría sintetizar y excretar una mayor cantidad de leucina, lo que permitiría el crecimiento bacteriano y la infección normal del nódulo. De ser cierta esta posibilidad, tal incremento de leucina excretada también debiera haber ocurrido en el interior del nódulo. Otra posibilidad no contemplada por estos autores es que la bacteria necesite un aporte especial de leucina o de algún intermediario metabólico de su ruta biosintética durante la infección del nódulo, que pudiera ser necesario, directa o indirectamente, para la síntesis de algún producto importante durante la infección del nódulo por la bacteria y su endocitosis posterior. En los nódulos formados por cepas  $Leu^-$ , las células del tejido central del nódulo no se diferenciaban, como ocurre en los nódulos silvestres, en células de mayor tamaño en las que se da un proceso de endoreduplicación del ADN (Truchet *et al.*, 1980). Son precisamente este tipo de células las que posteriormente alojarán a los bacteroides. Se especula con que la bacteria debe producir algún tipo de señal que induce la diferenciación de dichas células del nódulo, previa a la salida de las bacterias del cordón de infección y su posterior endocitosis. Dado que las cepas  $Leu^-$  no parecen producir tal señal, una posibilidad es que la leucina o alguno de sus intermediarios metabólicos sean necesarios para su producción.

En cualquier caso, ninguno de los auxotrofos para leucina descritos hasta el momento han sido genéticamente caracterizados, algo necesario para poder verificar el papel que las enzimas y/o compuestos intermediarios en la ruta biosintética de la leucina pueden tener en el proceso de infección y diferenciación nodular.

Este trabajo se inició con el aislamiento de cepas auxotrofas para la leucina derivadas de *S. meliloti* GR4. Tras una mutagénesis con el transposón Tn5 y el estudio de unos 5.000 transposantes, se identificaron dos cepas auxotrofas, GR401 y GR402, que resultaron contener inserciones del transposón diferentes, aunque sobre el mismo gen, denominado *leuA*. Extrañó el hecho de que se obtuviesen sólo dos cepas  $Leu^-$ , y que además portasen inserciones en un mismo gen, dado que al menos 4 genes diferentes son necesarios para la biosíntesis de leucina en bacterias. Entre otras posibles explicaciones, cabe la posibilidad de que algunos de estos genes estén duplicados en el genoma de esta bacteria, o que alguna otra enzima pudiera reemplazar al producto de los mismos. Como se evidenció posteriormente, este último podría ser el caso de la subunidad mayor de la  $\alpha$ -

isopropilmalato isomerasa de *S. meliloti* (LeuC), puesto que mutantes en el gen *leuC* caracterizado en este trabajo no mostraron la esperada auxotrofia. También es posible que el gen *leuB*, que codifica para la  $\beta$ -IPM deshidrogenasa, esté duplicado en el genoma de *S. meliloti*. Tras una búsqueda de secuencias homólogas a la proteína LeuB de *A. vinelandii* en el genoma de la cepa 1021, el programa Blast identificó dos posibles proteínas homólogas. Una de ellas, SMc04405, codificada en el cromosoma, está anotada como una posible  $\beta$ -IPM deshidrogenasa, y muestra un 47% de identidad con LeuB de *A. vinelandii*. Con la segunda, SMA1846, codificada en el pSymA y anotada como una posible deshidrogenasa, la identidad es del 38%. En cambio, si esta misma búsqueda se realiza utilizando la secuencia de aa de LeuB de *C. glutamicum*, SMA1846 aparece en primer lugar, con un 44% de identidad, mientras que SMc14405, anotada como  $\beta$ -IPM deshidrogenasa, queda en segundo lugar con un porcentaje de identidad de sólo el 35%. Estos datos indican que es bastante probable que algunos genes *leu* se encuentren duplicados en el genoma de *S. meliloti*, lo que explicaría la baja frecuencia de aparición de mutantes Leu<sup>-</sup> tras la mutagénesis con Tn5 de la cepa GR4.

La caracterización de las cepas GR401y GR402 demostró que en ambos casos la auxotrofia era debida a la interrupción del gen *leuA* que codifica para la  $\alpha$ -IPM sintasa, primera enzima de la ruta específica de la biosíntesis de leucina, que cataliza la síntesis de  $\alpha$ -IPM a partir de  $\alpha$ -KIV y acetil-CoA. Se caracterizó la secuencia de nucleótidos de una fragmento de 3.974 pb del cromosoma de *S. meliloti* GR4 que contiene el gen *leuA*. El análisis de la secuencia de aa deducida para la proteína LeuA indicaba que efectivamente se trata de esta proteína, pues en su secuencia están conservados los motivos comunes y esenciales para la actividad catalítica de este tipo de enzimas (Wang et al., 1991). Además, los mutantes en este gen carecen de actividad  $\alpha$ -IPM sintasa.

La anotación preliminar de proteínas deducidas de la secuencia del genoma de *S. meliloti* 1021 incluye 2 posibles  $\alpha$ -IPM sintasas. Los datos obtenidos en esta tesis indican que, en cualquier caso, sólo una de ellas, la caracterizada en este trabajo, presenta actividad  $\alpha$ -IPM sintasa y es necesaria para la biosíntesis de leucina durante el crecimiento en vida libre.

Se observó, tras la comparación de la secuencia de aa de LeuA con la de otras  $\alpha$ -IPM sintasas, que LeuA de *S. meliloti* es más parecida a las  $\alpha$ -IPM sintasas de levaduras y de bacterias Gram-positivas, que a las de Gram-negativas, lo que está en aparente

contradicción con la posición filogenética de *S. meliloti*, una bacteria Gram-negativa. Este hecho puede explicarse bajo la hipótesis de que el gen *leuA* caracterizado en este trabajo haya sido objeto de transferencia horizontal durante la evolución de esta bacteria. También el gen *leuA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* estaría en esta situación, lo que probablemente significa que este hipotético evento de transferencia horizontal ocurrió antes de la diversificación de los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. Cuando se realizó un análisis filogenético de  $\alpha$ -IPM sintetasas de diversos organismos, quedó evidenciado que la posición relativa de las proteínas no está en concordancia aparente con la filogenia de los organismos. Se identificaron dos lineajes de  $\alpha$ -IPM sintetasas, y en ambos grupos se incluían tanto organismos procariontes como eucariontes. Las  $\beta$ -IPM sintetasas filogenéticamente más cercanas a las de *Rhizobium* son las de dos firmibacterias, *C. glutamicum* y *M. tuberculosis*. Los datos genéticos obtenidos en este trabajo, junto a los de la secuencia del genoma de *S. meliloti* indican que es probable que varios de los genes *leu* estén duplicados en esta bacteria, lo que apoyaría aún más la hipótesis de la adquisición lateral de genes *leu*. Si esto fue así, queda en el aire la cuestión de cuál fue la ventaja evolutiva que tal adquisición génica tuvo para el *Rhizobium* ancestral en que supuestamente ocurrió, puesto que posiblemente dicha bacteria tenía ya sus propios genes para la biosíntesis de leucina. Un *Rhizobium* auxotrofo para leucina hubiese tenido pocas posibilidades de supervivencia. Además se trata de genes que codifican para proteínas con una actividad enzimática conservada entre todos los organismos que las poseen. Una posible ventaja selectiva podría haber sido la descoordinación de la expresión de algunos genes *leu* para disponer de ellos en procesos diferentes a los de biosíntesis de leucina.

La organización genética de la región *leuA* en *S. meliloti* GR4 y *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 es bastante parecida, acorde con la gran homología de secuencia que existe entre los dos genes *leuA*. En las dos especies el gen *leuA* parece no estar ligado a otros genes *leu*. En ambos casos, corriente arriba de *leuA* se encuentra el gen *clpP*, que se transcribe en la misma dirección de *leuA*. La secuencia de aa de la proteína ClpP está muy conservada (90% de identidad) entre ambas bacterias. Por el contrario, las secuencias del ADN inmediatamente corriente abajo de *leuA* en GR4 y UPM791 no muestran homología significativa. A diferencia de *S. meliloti* GR4, entre los genes *leuA* y *clpP* de *R. leguminosarum* existe un posible gen, cuyo producto muestra homología significativa a un transportador de benzoato (BenE) identificado en varias especies bacterianas. Se

desconoce por el momento la función de este posible gen en la cepa UPM791. Esta diferencia tal vez sólo ocurra entre GR4 y UPM791, ya que es probable que en la cepa 1021 de *S. meliloti* también exista uno o más genes en la región intergénica *clpP-leuA*. Con la información que hay disponible en el servidor Blast del genoma de *S. meliloti* 1021, se deduce que en la cepa 1021, entre el final de ClpP y el inicio de LeuA existe una secuencia de 1.796 nt, mientras que en la cepa GR4 esta secuencia es de sólo 470 nt.

Las cepas *leuA* de *S. meliloti* y *R. leguminosarum* bv. *viciae* son auxotrofas para la leucina, puesto que necesitan de la presencia de este aa en el medio de cultivo para crecer. En ambos casos, las mutaciones en *leuA* provocan la pérdida de actividad  $\alpha$ -IPM sintasa. El crecimiento también se restablece en medios que contengan una fuente de nitrógeno fijado y  $\alpha$ -KIC, el precursor directo de la leucina. Sin embargo la adición al medio de  $\alpha$ -IPM no restablece el crecimiento de estas cepas. La misma situación se dio para un mutante *leuA* de *E. coli*. Es probable que las membranas celulares de estas bacterias no sean permeables a  $\alpha$ -IPM, como parece ser el caso en *S. cerevisiae* y *N. crassa* (Reichenbecher *et al.*, 1978). Esta posible impermeabilidad de las células de *Rhizobium* al  $\alpha$ -IPM ha dificultado en gran medida la verificación del posible papel que este compuesto puede jugar no sólo en la biosíntesis de leucina, sino también durante el establecimiento de las simbiosis con leguminosas.

Como se ha expuesto anteriormente, en *S. meliloti* GR4 y 1021, así como en *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791, las mutaciones en el gen *leuA* provocan una incapacidad para sintetizar leucina, asociada a la pérdida de la actividad enzimática  $\alpha$ -IPM sintasa. Otra consecuencia de estas mutaciones es la pérdida de la capacidad para establecer simbiosis efectivas con sus respectivas plantas hospedadoras, alfalfa en el caso de *S. meliloti*, o guisante y veza en el caso de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. En el caso de *S. meliloti*, los mutantes LeuA<sup>-</sup> son incapaces de inducir la formación de nódulos, por lo que se les ha asignado un fenotipo Nod<sup>-</sup>. Las cepas LeuA<sup>-</sup> de *R. leguminosarum* bv. *viciae* también presentan un fenotipo simbiótico Nod<sup>-</sup> en guisante, mientras que en veza el fenotipo es algo más confuso, puesto que en ciertas plantas se formaron nódulos no fijadores de nitrógeno, mientras que en otras la nodulación no llegó a ocurrir. Es probable, como se discutirá más adelante, que la diferencia venga establecida por los niveles de leucina excretados por las raíces vegetales. Es posible que si las raíces de alfalfa o guisante excretaran suficiente leucina, los mutantes LeuA<sup>-</sup> tal vez pudiesen inducir la formación de

nódulos, que posiblemente serían no fijadores, como describieron Truchet y colaboradores (1980). Esto explicaría las diferencias fenotípicas encontradas entre los mutantes  $Leu^-$  descritos por estos autores y los caracterizados en este trabajo. Las diferencias puntuales entre las plantas de veza para la excreción de leucina podrían también explicar por qué los mutantes *leuA* solo formaron nódulos  $Fix^-$  en la mitad de estas plantas. Si hay un suficiente aporte de leucina o algún otro compuesto por parte de la planta que permita crecer a los mutantes  $LeuA^-$ , éstos podrían con ello conseguir la síntesis de factores Nod e inducir la formación de nódulos. Estos nódulos quedarían seguramente vacíos si dicho aporte de leucina no continúa dentro del nódulo.

Con estos datos, parece claro que la principal causa del fenotipo simbiótico mostrado por los mutantes  $LeuA^-$  se debe a su incapacidad metabólica y la limitación de su crecimiento en la rizosfera de las respectivas plantas hospedadoras, cuyos exudados no contienen suficiente leucina. No obstante, esta limitación nutritiva sería dominante, provocando un colapso metabólico general, y podría estar enmascarando los efectos de la mutación sobre otros procesos importantes para el establecimiento de la simbiosis.

Efectivamente, el aporte exógeno de leucina o  $\alpha$ -KIC provocó la reversión del fenotipo  $Nod^-$  de los mutantes *leuA* de *S. meliloti* en alfalfa. Los nódulos formados en ambos casos fueron de morfología similar a los de la cepa silvestre, de color rosado y fijadores de nitrógeno, a juzgar por el aspecto saludable de las plantas. Estos resultados están en concordancia con los publicados por Truchet *et al.* (1980). Sin embargo, sólo con  $\alpha$ -KIC se consiguieron recuperar cinéticas de nodulación similares a las de la cepa silvestre, mientras que en el medio suplementado con leucina los mutantes  $LeuA^-$  todavía mostraron un retraso considerable en relación a la cepa parental GR4. Esta diferente respuesta de los mutantes *leuA* a la leucina y el  $\alpha$ -KIC exógenos puede deberse al distinto efecto que sobre la planta puede tener cada uno de estos compuestos. No obstante, debe indicarse aquí que la adición de leucina a la solución mineral de alfalfa no tuvo efectos significativos sobre la nodulación por la cepa silvestre GR4 (datos no presentados). Si bien tanto la leucina como el  $\alpha$ -KIC restablecen el crecimiento de los mutantes *leuA* en vida libre, las diferencias en el rescate de la capacidad de nodulación por cada compuesto podrían explicarse considerando que el defecto simbiótico provocado por la mutación no se deba exclusivamente a la limitación metabólica provocada por la carencia de leucina en los mutantes  $Leu^-$ , sino también a la deficiencia en alguno de sus intermediarios metabólicos.

Las cepas *leuA* de *S. meliloti* también recuperaron la capacidad de nodular cuando se añadieron a la solución mineral de la planta los intermediarios metabólicos  $\alpha$ -KIV y  $\alpha$ -IPM, aún cuando estos compuestos no pueden ser metabolizados por estos mutantes. En ambos casos, sobre todo con  $\alpha$ -IPM, la nodulación ocurrió de manera bastante retrasada y se formaron dos tipos de nódulos, incluso sobre las mismas plantas: algunos eran rosados y de aspecto normal, mientras que otros eran blancos y redondeados, similares a los que forma la cepa GR402 (*leuA::Tn5*). El rescate de la capacidad simbiótica por  $\alpha$ -KIV también fue descrita por Truchet y col. (1980), quienes observaron que este compuesto restauraba parcialmente la capacidad fijadora de nitrógeno en los nódulos formados por sus mutantes *Leu*<sup>-</sup>. Estos autores no utilizaron el  $\alpha$ -IPM en sus experimentos. Sin embargo, parece contradictorio que el  $\alpha$ -IPM o el  $\alpha$ -KIV restablezcan la capacidad simbiótica de las cepas *leuA*, dado que no son capaces de restablecer el crecimiento en ausencia de leucina. Para explicar esta situación, Truchet *et al.* (1980) sugirieron que en presencia de  $\alpha$ -KIV, la planta podría producir y excretar una mayor cantidad de leucina, lo que permitiría restablecer el crecimiento de las cepas *Leu*<sup>-</sup>, explicándose así la recuperación de la capacidad simbiótica.

Bajo nuestras condiciones experimentales, las raíces de alfalfa no parecen producir suficiente leucina para permitir el crecimiento de cepas *leuA* de *S. meliloti*. Este dato está avalado por la ausencia de crecimiento de estos mutantes en la solución mineral de las plantas, a diferencia de la cepa silvestre, así como porque este aa no fue detectado entre los aa presentes en la misma solución mineral. Tampoco se detectó la excreción de leucina por raíces de alfalfa cuando a la solución mineral se adicionaron intermediarios metabólicos de la leucina, aunque si se apreciaron cambios en la cantidad y calidad de los exudados tras la adición de  $\alpha$ -KIC, compuesto que indujo en las raíces una mayor excreción de asparagina y alanina. Con  $\alpha$ -IPM no se observaron cambios significativos en el perfil de aa excretados por la raíz, si bien quedó evidenciado un cambio en los exudados que permitió el crecimiento, tardío y limitado, del mutante *leuA* en esas condiciones. No obstante, la adición de  $\alpha$ -KIV al medio de cultivo de alfalfa no condujo ni a un aumento en la excreción de leucina, ni a cambios significativos en el perfil de los aa excretados, ni a un mayor crecimiento del mutante en la solución mineral de las plantas. A pesar de ello, y de que el  $\alpha$ -KIV no puede ser usado por la cepa *leuA* para sintetizar leucina, este compuesto permitió la formación de nódulos por el mutante. La acumulación de todos estos resultados

sugería que la deficiencia simbiótica mostrada por los mutantes *LeuA*<sup>-</sup> no se debía exclusivamente a la incapacidad de esta bacteria para crecer a expensas de los exudados radicales, incapacidad provocada por la auxotrofia para leucina. Tal vez las mutaciones en *leuA* afecten negativamente a otros procesos importantes para la nodulación.

Puesto que las cepas *LeuA*<sup>-</sup> no son capaces de inducir la formación de nódulos en alfalfa, cabía la posibilidad de que en estas cepas la expresión de los genes de la nodulación estuviese de algún modo alterada como consecuencia de la mutación. Se pudo observar que la expresión de los genes *nodD1* y *nodD3* no está afectada de manera significativa por las mutaciones en *leuA*. Por el contrario, la expresión de *nodC*, que depende de la proteína activadora NodD y de la presencia de luteolina u otros flavonoides producidos por alfalfa, sí que estaba alterada en estos mutantes, alcanzando niveles de sólo el 10% de la cepa silvestre en presencia de leucina o  $\square$ -KIC, compuestos que deben estar presentes en el medio de cultivo de los mutantes *LeuA*<sup>-</sup>.

En *S. meliloti*, el principal activador de los genes *nod* en respuesta a la luteolina es la proteína NodD1, mientras que NodD2 parece activar la expresión en respuesta a otro tipo de flavonoides minoritarios presentes en los exudados de alfalfa (Honma *et al.*, 1990). NodD3 activa los genes *nod* independientemente de los flavonoides (Maillet *et al.*, 1990; Kondorosi *et al.*, 1991; Swanson *et al.*, 1993). En realidad la activación por NodD3 es más bien regulada por el nivel de la expresión del gen *nodD3*, sujeta a un complejo control en el que intervienen SyrM, NodD1, NodD3 y al menos dos elementos más que aún son desconocidos (Kondorosi *et al.*, 1991).

Por tanto, la baja inducibilidad de genes *nod* en el mutante *LeuA*<sup>-</sup> en presencia de luteolina posiblemente se debe a una deficiencia en la activación por NodD1. Por el contrario, la activación por NodD3, que no depende de flavonoides, no está alterada en estos mutantes, como lo demuestra el hecho de que la expresión de una fusión *nodH-lacZ*, que se expresa de manera constitutiva gracias a la presencia de copias adicionales de *syrM* y *nodD3* (Maillet *et al.*, 1990) fue similar en las cepas mutante y silvestre.

Los resultados hasta entonces indicaban que las mutaciones en *leuA*, además de provocar una auxotrofia para la leucina, alteran la activación de los genes *nod* por la proteína NodD1, pero no por NodD3. Sin embargo las cepas *leuA* de *S. meliloti* muestran algo de inducción de genes *nod* en respuesta a luteolina, inducción que podría ser suficiente para conseguir formar nódulos en la planta hospedadora en dichas condiciones.

Se sabe que no es necesario inducir los genes *nod* al 100% para conseguir la formación de nódulos. De hecho, los mutantes *nodD1* de *S. meliloti* muestran un nivel casi inapreciable de inducción de genes *nod* en respuesta a luteolina. Sin embargo, estas cepas son capaces de nodular, aunque con un considerable retraso (Honma *et al.*, 1990; Honma y Ausubel, 1987; Göttfert *et al.*, 1986). Este también es el caso de las cepas *leuA*, puesto que la baja inducción de genes *nod* que se determinó fue siempre en medios que contenían leucina o  $\alpha$ -KIC, imprescindibles para permitir el crecimiento de estas cepas. Y como se ha discutido anteriormente, los mutantes *leuA* recuperaron la capacidad de nodular en presencia de leucina o  $\alpha$ -KIC exógenos. Por tanto, en presencia de leucina exógena, los mutantes *leuA* se comportan de manera parecida a los mutantes *nodD1*: muestran un bajo nivel de inducción de genes *nod* en respuesta a luteolina, pero son capaces de nodular, si bien con un retraso considerable.

En el caso de las cepas *leuA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, la situación fue diferente: tanto la expresión del gen *nodD* como la inducción por naringenina del promotor de *nodA* en el mutante *leuA* fueron similares a los de la cepa silvestre, obviamente en medios que contenían leucina o  $\alpha$ -KIC. Sin embargo estos mutantes o bien no forman nódulos, o forman nódulos no fijadores de manera muy retrasada. Todo ello en medios a los que no se adicionan los compuestos que permiten su crecimiento. Cabía por tanto la posibilidad de que bien la leucina, bien el  $\alpha$ -KIC, pudieran estar restableciendo también la capacidad de NodD de *R. leguminosarum* para inducir los genes *nod*. Restablecimiento que en el caso de NodD1 de *S. meliloti* pudiera ser sólo parcial, de ahí el bajo nivel de inducción de *nodC* que se observó en el mutante GR410 en presencia de  $\alpha$ -KIC o leucina.

Se hacía necesario, por tanto, determinar la activación de genes *nod* por flavonoides en las cepas *leuA* en ausencia de leucina o  $\alpha$ -KIC. Para ello sólo cabía la posibilidad de hacer los ensayos de expresión en medios carentes de nitrógeno fijado, puesto que cualquier otra situación hubiese supuesto una desventaja nutritiva de estos mutantes con respecto a las cepas silvestres. En medios carentes de una fuente de nitrógeno fijado, la proteína NodD3 de *S. meliloti* activó la expresión de *nodA* a altos niveles, tanto en la cepa mutante *leuA* como en la silvestre. Este resultado confirmaba que la activación de genes *nod* por la proteína NodD3, que no requiere de flavonoides, no está alterada en cepas *leuA*. Además, los resultados mostraban que a pesar del estrés nutritivo impuesto a

las células (ausencia de nitrógeno combinado), las condiciones experimentales permitían determinar la expresión de genes *nod*.

Por el contrario, bajo estas mismas condiciones, en ausencia de leucina o  $\alpha$ -KIC, NodD1 sólo activó el promotor de *nodA* en la cepa silvestre pero no en el mutante LeuA<sup>-</sup>. En esta cepa sólo se observó activación en presencia de  $\alpha$ -KIC o de leucina, situación en que, como se ha discutido anteriormente, la proteína NodD1 producida por la cepa mutante presenta cierta capacidad activadora de la transcripción de genes *nod*.

Del mismo modo, en medio carente de nitrógeno fijado y en presencia de naringenina, el mutante *leuA* de *R. leguminosarum* apenas mostró activación de *nodA*, mientras que en la cepa silvestre esta activación fue bastante aparente. En cambio, la expresión de *nodD*, independiente de flavonoides, fue similar en ambas cepas, mutante y silvestre, en las condiciones de limitación de nitrógeno impuestas. Debe recalarse aquí que ninguno de los intermediarios de la leucina usados,  $\alpha$ -KIV,  $\alpha$ -IPM y  $\alpha$ -KIC, aporta nitrógeno a las células, por lo que el rescate por  $\alpha$ -KIC de la activación de genes *nod* por flavonoides en los mutantes *leuA*, es atribuible al compuesto en sí y no a un alivio en la limitación de nitrógeno impuesta. Por otra parte, la activación de genes *nod* dependiente de flavonoides por cepas LeuA<sup>-</sup> no fue rescatada por  $\alpha$ -IPM exógeno, aunque debe tenerse en cuenta que este compuesto no está disponible para las células, posiblemente debido a una impermeabilidad de las mismas.

Con estos datos, parece claro que en ambas especies de *Rhizobium* es necesario un gen *leuA* activo para la correcta activación por flavonoides de los genes *nod*. No parece que esté alterado el proceso de la transcripción en sí, puesto que al menos en *S. meliloti*, la activación de genes *nod* por NodD3 no está afectada, como tampoco parece estarlo la transcripción de los genes *nodD*.

Aún cuando se intentó determinar si esta alteración de la inducción de los genes *nod* por flavonoides también ocurre en otros mutantes en la ruta de biosíntesis de leucina, este extremo no pudo llevarse a cabo puesto que la mutación en el gen *leuC* de *S. meliloti* no provocó la auxotrofia esperada, ni ningún tipo de alteración del proceso de nodulación. Es posible que en *S. meliloti* haya otras proteínas que pueden reemplazar a la proteína LeuC en su actividad enzimática, cosa que no sería extraña a la vista de que otros genes *leu* pudieran estar duplicados en esta bacteria.

¿Cuál puede ser el mecanismo por el que el gen *leuA* participa en la inducción de los genes de nodulación por flavonoides a través de NodD? Parece claro que bien la proteína LeuA, y/o el producto de su actividad enzimática,  $\alpha$ -IPM, son necesarios para esta activación por NodD y flavonoides. Alternativamente, y puesto que las mutaciones en *leuA* provocan indirectamente una anulación de toda la ruta biosintética de la leucina, la carencia de otro intermediario de la leucina pudiera ser la responsable de la ausencia de activación por flavonoides de los genes *nod*.

La proteína LeuA parece ser una típica  $\alpha$ -IPM sintasa, por lo que parece poco probable que tenga algún tipo de papel regulador de algún componente necesario para la activación transcripcional de los genes *nod*. Parece más probable que la carencia de algún intermediario metabólico de la leucina,  $\alpha$ -IPM,  $\beta$ -IPM o  $\alpha$ -KIC, sea responsable de los defectos descritos a nivel de la activación de genes *nod* en cepas *LeuA*<sup>-</sup>. Salvo el  $\alpha$ -KIC, intermediario también en el catabolismo de la leucina hasta hidroxiácidos, estos metabolitos son exclusivos de la ruta biosintética de la leucina. Resulta difícil predecir si la carencia de leucina misma pudiera ser la responsable, puesto que este aminoácido puede ser convertido en  $\alpha$ -KIC por procesos de desaminación. No existen apenas precedentes de que estos intermediarios metabólicos participen en otros procesos diferentes a la biosíntesis o catabolismo de leucina. No obstante, es conocido que el  $\alpha$ -IPM funciona como modulador de la actividad de la proteína Leu3 en levaduras, concretamente en *S. cerevisiae*. Leu3 es una proteína reguladora de la transcripción de diversos genes, incluido el gen *leu4* que codifica para la  $\alpha$ -IPM sintasa I, y el gen *GDH*, que codifica para la glutamato deshidrogenasa, enzima clave para la asimilación del amonio en esta levadura (Peters *et al.*, 1990; Hu *et al.*, 1995). La proteína Leu3 requiere de  $\alpha$ -IPM para la activación transcripcional de todos estos genes, y en ausencia de este compuesto, Leu3 se comporta como un represor o bien es inactiva (Sze *et al.*, 1992). El paso de Leu3 inactiva a Leu3 activa implica la unión de  $\alpha$ -IPM a la proteína. Este compuesto facilita la interacción intramolecular de la parte central de la proteína Leu3 con el denominado dominio activador, localizado en el extremo C-terminal de la proteína. Esta interacción intramolecular en presencia de  $\alpha$ -IPM conduce al “desenmascaramiento” del dominio activador, lo que permite el inicio de la transcripción génica (Wang *et al.*, 1997, 1999). Por tanto, existe un precedente de la necesidad de un intermediario de la biosíntesis de leucina, en este caso el  $\alpha$ -IPM, en procesos de regulación de la expresión génica. Aunque Leu3 no

presenta homología aparente con NodD, las dos proteínas reguladoras poseen una particularidad común: ambas están unidas de forma permanente a las secuencias promotoras que reconocen (Györgypal *et al.*, 1991; Schlaman *et al.*, 1992; Kirkpatrick y Schimmel, 1995), pero la activación del promotor sólo ocurre en presencia de un compuesto modulador:  $\alpha$ -IPM para Leu3, o flavonoides en el caso de NodD.

Por tanto, es posible que las proteínas NodD que activan la expresión de genes *nod* en respuesta a flavonoides de la planta, también necesiten, directa o indirectamente, de alguno de los intermediarios de la leucina para su actividad. Puesto que la actividad de NodD3 de *S. meliloti*, que no necesita de flavonoides para activar promotores *nod*, no está alterada en mutantes *leuA*, es posible que este intermediario de la leucina sea necesario para la adecuada interacción de la proteína NodD con la molécula señal correspondiente. Se piensa que esta interacción NodD-flavonoide es un requisito indispensable para que ocurra un cambio conformacional en la proteína, lo que se traduce en una activación de los promotores *nod* a los que NodD está permanentemente unido (Györgypal *et al.*, 1991; Schlaman *et al.*, 1992).

Puesto que las mutaciones en el gen *leuA* tienen como consecuencia una alteración en toda la ruta biosintética de la leucina, y dado que las células de *Rhizobium* parecen impermeables al  $\alpha$ -IPM, resulta difícil determinar cuál de los metabolitos intermediarios de la leucina puede ser necesario para la activación de genes *nod* por NodD en respuesta a flavonoides. Este extremo podría ser aclarado una vez se obtengan cepas carentes de cada una de las actividades enzimáticas de la ruta biosintética. Aún así, es posible que no sea uno de estos metabolitos los que directamente requiere NodD para su actividad, sino que por el contrario podría tratarse de otro compuesto en cuya biosíntesis intervengan aquéllos. La hipótesis más simple, dado que existe un precedente de la interacción directa de  $\alpha$ -IPM con un regulador transcripcional en *S. cerevisiae*, sería la de que éste u otro intermediario de la leucina, el  $\beta$ -IPM o el  $\alpha$ -KIC, interaccionen directamente con el complejo NodD-flavonoides-caja *nod*. El  $\alpha$ -KIC podría ser un candidato, puesto que este compuesto restauró completamente la activación de genes *nod* en la cepa LeuA<sup>-</sup> de *R. leguminosarum*, si bien lo hizo sólo parcialmente en el caso del mutante *leuA* de *S. meliloti*. Además, el  $\alpha$ -KIC fue el único compuesto que de forma exógena permitió a los mutantes LeuA<sup>-</sup> de *S. meliloti* recuperar cinéticas de nodulación similares a las de la cepa silvestre. Como en el caso de *S. cerevisiae*, podría tratarse del  $\alpha$ -IPM, aunque por distintas

circunstancias este extremo no ha podido ser verificado. En ausencia de biosíntesis de  $\alpha$ -IPM, otro intermediario de la leucina como  $\alpha$ -KIV o  $\alpha$ -KIC, o la leucina misma presentes en el medio, podrían reemplazar de manera inespecífica al  $\alpha$ -IPM en su interacción con NodD1, lo que explicaría la recuperación de cierta nivel de activación de genes *nod* por NodD1 en cepas *LeuA*<sup>-</sup> de *S. meliloti*, así como de la capacidad de nodulación en presencia de todos estos compuestos. Esta posibilidad también podría explicar por qué en células *LeuA*<sup>-</sup> de *S. meliloti* que sobreproducen la proteína NodD1, así como en cepas *LeuA*<sup>-</sup> de *R. leguminosarum*, el  $\alpha$ -KIC o la leucina restauran la expresión del gen *nodA* a niveles similares a la cepa silvestre.

Cualquiera que sea el intermediario de la leucina necesario para la activación de genes *nod* por NodD y flavonoides, otra posibilidad es que dicho compuesto sea necesario, directa ó indirectamente, para el correcto plegamiento de la proteína NodD. En este sentido se ha descrito que las chaperonas GroESL son necesarias para la actividad de NodD en *S. meliloti*. No obstante estas chaperonas parecen ser necesarias para el correcto plegamiento tanto de NodD1 como de NodD3 (Ogawa y Long, 1995), y como se ha visto en este trabajo, las mutaciones en *leuA* no afectan a la actividad de la proteína NodD3.

En este trabajo se ha iniciado el estudio de la regulación de la expresión de genes *leuA* en *Rhizobium*. En enterobacterias es bastante común que la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos esté regulada negativamente por el aminoácido correspondiente. Éste es el caso del operón *leuABCD* de *E. coli* y *S. typhimurium*, sujetos a un mecanismo de atenuación de la transcripción modulado por los niveles de leucina intracelular (Landick *et al.*, 1996). La represión de la expresión de este operón puede observarse en relación a la presencia de leucina en el medio de cultivo.

En el caso de *S. meliloti* y *R. leguminosarum*, en la región 5' de los genes *leuA*, arriba de la zona codificante para las proteínas *LeuA*, se identificaron secuencias reminiscentes de una posible regulación por atenuación: una secuencia que podría codificar para un péptido de 41 aa que contiene 4 codones contiguos para leucina, y una secuencia que potencialmente podría determinar la formación de estructuras secundarias en el ARN. A pesar de ello, la expresión de los correspondientes genes *leuA* no parece estar modulada por los niveles de leucina exógena. En ambos casos, *leuA* se expresa de una manera aparentemente constitutiva, con independencia de la presencia de leucina en el medio de

cultivo. Esta expresión fue similar en células de la cepa silvestre o de mutantes *leuA*, lo que indica que no existe autorregulación de este gen, como es el caso en *S. cerevisiae*, en que la expresión del gen de la  $\alpha$ -IPM sintasa está sujeto a autorregulación a través de la interacción del  $\alpha$ -IPM con la proteína reguladora Leu3 (Peters *et al.*, 1990). No obstante, se observó que la expresión de *leuA* en los mutantes  $\text{LeuA}^-$  se incrementaba proporcionalmente al aumento de la concentración de leucina en el medio de cultivo, si bien este efecto sólo pudo observarse en el caso de fusiones traduccionales a *gusA*, pero no en el caso de una fusión transcripcional de *leuA* de *S. meliloti* a *lacZ*. Estos resultados indican que los genes *leuA* de *Rhizobium* no están sujetos a represión por el producto final de la ruta biosintética, leucina. Además, los estudios preliminares de expresión durante la simbiosis sugieren que estos genes *leuA* se expresan también en el interior de nódulos de las leguminosas hospedadoras, aunque no ha podido determinarse si esta expresión ocurre en todas las zonas en que se encuentra la bacteria, fundamentalmente en los cordones de infección y en el interior de las células vegetales infectadas, o si por el contrario se limita a zonas del nódulo específicas, lo que sería indicativo de una regulación de su expresión.

## CONCLUSIONES

---

## Conclusiones

---

1. Los genes *leuA* de *Sinorhizobium meliloti* y *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, que codifican para típicas  $\alpha$ -isopropilmalato sintasas, son necesarios para la biosíntesis de leucina y para la inducción de la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en las correspondientes leguminosas hospedadoras.
2. El fenotipo Nod<sup>-</sup> exhibido por cepas LeuA<sup>-</sup> de *S. meliloti* y *R. leguminosarum* bv. *viciae* se debe a la combinación de dos efectos diferentes: una auxotrofia para la leucina y una incapacidad para inducir correctamente la expresión de los genes de la nodulación en respuesta a las señales de tipo flavonoide producidas por las plantas hospedadoras.
3. Se propone que un compuesto intermediario en la biosíntesis de leucina es necesario para la correcta interacción de la proteína reguladora NodD con los flavonoides vegetales, a fin de activar la expresión de los genes de la nodulación bacterianos. Dicho metabolito intermediario no es necesario para la activación de genes *nod* independiente de flavonoides.
4. Los genes *leuA* de *S. meliloti* y *R. leguminosarum* bv. *viciae* no están ligados a otros genes implicados en la biosíntesis de leucina, y muestran una expresión aparentemente constitutiva.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Aguilar, O.M., y Grasso, D.H., 1991.** The product of the *Rhizobium meliloti* *ilvC* gene is required for isoleucine and valine synthesis and nodulation of alfalfa. *J. Bacteriol.* **173**: 7756-7764.
- Allen, N.S., Bennett, M.N., Cox, D.N., Shipley, A., Ehrhardt, D.W., y Long, S.R., 1994.** Effects of Nod Factors on alfalfa root hair Ca<sup>++</sup> and H<sup>+</sup> currents and cytoskeleton behavior. En: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, vol. 3. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 107-114.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., y Lipman, D.J., 1990.** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Ardourel, M., Demont, N., Debellé, F., Maillet, F., De Billy, F., Promé, J.C., y Truchet, G., 1994.** *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell.* **6**: 1357-1374.
- Asad, S., Fang, Y., Wycoff, K.L., y Hirsch, A.M., 1994.** Isolation and characterization of cDNA and genomic clones of MsENOD40; transcripts are detected in meristematic cells of alfalfa. *Protoplasma.* **183**: 10-23.
- Atkinson, E.M., Palcic, M.M., Hindsgaul, O., y Long, S.R., 1994.** Biosynthesis of *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide Nod factors: NodA is required for an *N*-acyltransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 8418-8422.
- Bae, Y.M., Holmgren, E., y Crawford, I.P., 1989. ***Rhizobium meliloti* anthranilate synthase gene: cloning, sequence, and expression in *Escherichia coli*.** *J. Bacteriol.* **171**: 3471-3478.
- Baev, N., Endre, G., Petrovics, G., Banfalvi, Z., y Kondorosi, A., 1991.** Six nodulation genes of *nod* box locus 4 in *Rhizobium meliloti* are involved in nodulation signal production: *nodM* codes for D-glucosamine synthetase. *Mol. Gen. Genet.* **228**: 113-124.
- Barnett, M.J., y Long, S.L., 1997.** Identification and characterization of a gene on *Rhizobium meliloti* pSyma, *syrB*, that negatively affects *syrM* expression. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 550-559.
- Barsomian, G.D., Urzainqui, A., Lohman, K., y Walker, G.C., 1992.** *Rhizobium meliloti* mutants unable to synthesize anthranilate display a novel symbiotic phenotype. *J. Bacteriol.* **174**: 4416-4426.
- Bassam, B.J., Djordjevic, M.A., Redmond, J.W., Batley, M., y Rolfe, B.G., 1988.** Identification of a *nodD*-dependent locus in the *Rhizobium* strain NGR234 activated by phenolic factors secreted by soybeans and other legumes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1**: 161-168.

- Battisti L., Lara J.C., y Leigh J.A., 1992.** Specific oligosaccharide from the *R. meliloti* exopolisaccharide promotes nodule invasion in alfalfa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89** (12):5625-5629.
- Bauer, P., Ratet, P., Crespi, M.D., Schultze, M., y Kondorosi, A., 1996.** Nod factors and cytokinins induce similar cortical cell division, amyloplast deposition and *MsEnod12A* expression patterns in alfalfa roots. *Plant J.* **10**: 91-105.
- Blantny, J.M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H.C., Haugan, K., y Valla,S. 1997.** Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:370-379.
- Bradford, M.N., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Beringer, J.E., Brewin, N.J., y Johnston, A.W.B., 1980.** The genetic analysis of *Rhizobium* in relation to symbiotic nitrogen fixation. *Heredity.* **45**: 161-186.
- Bloemberg, G.V., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J.J., y Spaink, H.P., 1994.** Nodulation protein NodL of *Rhizobium leguminosarum* O-acetylates lipo-oligosaccharides, chitin fragments and N-acetylglucosamine *in vitro*. *Mol. Microbiol.* **11**: 793-804.
- Bloemberg, G.V., Kamst, E., Hartevelde, M., van der Drift, K.M.G.M., Haverkamp, J., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J.J., y Spaink, H.P., 1995.** A central domain of *Rhizobium* NodE protein mediates host specificity by determining the hydrophobicity of fatty acyl moieties of nodulation factors. *Mol. Microbiol.* **16**: 1123-1136.
- Boyer. H. W., y Roulland-Dussoix, D. 1969.** A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* **41**: 459-465.
- Broughton,WJ., Jabbouri, S., Perret, X., 2000.** Keys to symbiotic harmony. *J. Bacteriology.* **182**(20): 5641-52.
- Buendía, A., Moreno, F.J., Moussaid, A., Ollero, F.J., Torres, A., y Ruiz-Sainz, J.E. 2000.** Characterization of a purine auxotrophic mutant of *S. fredii* HH103. Libro de resúmenes Fourth European Nitrogen Fixation Conference. Sevilla 2000. p.84.
- Burn, J., Rossen, L., y Johnston, A.W.B., 1987.** Four classes of mutations in the *nodD* gene of *R. leguminosarum* bv. *viciae* that affect its ability to autoregulate and/or activate other genes in the presence of flavonoid inducers. *Genes Dev.* **1**: 456-464.
- Burn, J., Hamilton, W.D., Wootton, J.C., y Johnston, A.W.B., 1989.** Single and multiple mutations affecting properties of the regulatory gene *nodD* of *Rhizobium*. *Mol. Microbiol.* **3**: 1567-1577.

- Caetano-Anollés, G., Wall, L.G., de Micheli, A.T., Macchi, E.M., Bauer, W.D., y Favelukes, G., 1988.** Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* **86**: 1228-1235.
- Callahan, D.A., y Torrey, J.G., 1981.** The structural basis of infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Canadian Journal of Botany.* **59**: 1647-1664.
- Cárdenas, L., Domínguez, J., Santana, J., y Quinto, C., 1996.** Role of the *nodI* and *nodJ* genes in the transport of Nod metabolism in *Rhizobium etli*. *Gene.* **173**: 183-187.
- Carlson, R.W., Sanjuan, J., Bhat, U.R., Glushka, J., Spaink, H.P., Wijfjes, A.H.M., van Brussels, A.A.N., Stokkermans, T.J.W., Peters, N.K., y Stacey, G., 1993.** The structures and biological activities of the lipo-oligosaccharide nodulation signals produced by type 1 and type 2 strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biol. Chem.* **268**: 18372-18381.
- Carlson, R.W., Price, N.P.J., y Stacey, G., 1994.** The biosynthesis of rhizobial lipo-oligosaccharide nodulation signal molecules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**: 684-695.
- Casadesús, J., y Olivares, J., 1979.** Rough and fine linkage mapping of the *Rhizobium meliloti* chromosome. *Molec. Gen. Genet.* **174**: 203-209.
- Cook, D., Dreyer, D., Bonnet, D., Howell, M., Nony, E., y vandenBosch, K., 1995.** Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell.* **7**: 43-55.
- Cooper, J.B., y Long, S.R., 1994.** Morphogenetic rescue of *Rhizobium meliloti* nodulation mutants by *trans*-zeatin secretion. *Plant Cell.* **6**: 215-225.
- Coronado, C., Sanchez-Andujar, B., y Palomares, A.J., 1996.** *Rhizobium* extracellular structures in the symbiosis. *World J. Microbiol Biotechnol.* **12**: 127-136.
- Corvera, A., Promé, D., Promé, J.C., Martínez-Romero, E., y Romero, D., 1999.** The *nolL* gene from *Rhizobium etli* determines nodulation efficiency by mediating the acetylation of the fucosyl residue in the nodulation factor. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**(3): 236-246.
- Cren, M., Kondorosi, A., y Kondorosi, E., 1995.** NolR controls expression of the *Rhizobium meliloti* nodulation genes involved in the core Nod factor synthesis. *Mol. Microbiol.* **15**: 733-747.
- Cullimore, J.V., Ranjeva, R., y Bono, J.J., 2001.** Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci.* **6**:24-30.
- Davis, E.O., Evans, I.J., y Johnston, A.W.B., 1988.** Identification of *nodX*, a gene that allows *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain TOM to nodulate Afghanistan peas. *Mol. Gen. Genet.* **212**: 531-535.

**Dazzo, F.B., Hollingsworth, R.I., Sherwood, J.E., Abe, M., Hrabak, E.M., Gardiol, A.E., Pankratz, H.S., Smith, K.B., y Yang, H., 1985.** Recognition and infection of clover root hairs by *Rhizobium trifolii*. En: Nitrogen fixation research progress. Evans, H.J., Bottomley, P.J., y Newton, W.E. (eds). Martinus Nijhoff, Dordrecht, Países Bajos. pp 239-245

**Dazzo, F.B., Hollingsworth, R., Philip-Hollingsworth, S., Robeles, M., Olen, T., Salzwedel, J., Djordjevic, M., y Rolfe, B., 1988.** Recognition process in the *Rhizobium trifolii*-white clover symbiosis. En: Nitrogen fixation, hundred years after. Bothe, H., De Bruijn, F.J., y Newton, W.E. (eds). Gustav Fisher Verlag, Stuttgart-Nueva York. pp 431-435.

**Dazzo, F.B., y Truchet, G., 1987.** Interactions of lectins and their saccharide receptors in the *Rhizobium*-legume symbiosis. J. Membrane Biol. **73**: 1-16.

**Debellé, F., Plazanet, C., Roche, P., Pujol, C., Savagnac, A., Rosenberg, C., Promé, J.C., y Denarié, J., 1996.** The NodA proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the *N*-acylation of Nod factors by different fatty acids. Mol. Microbiol. **22**: 303-314.

**De Maagd, R.A., Rao, A.S., Mulders, I.H.M., Leentje, G.R., Loosdrecht, M.C.M., Wijffelman, C.A., y Lugtenberg, B.J.J., 1989.** Isolation and characterization of mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 248 with altered lipopolysaccharides: possible role of surface charge of hydrophobicity in bacterial release from the infection thread. J. Bacteriol. **171**: 1143- 1150.

**Demont, N., Debellé, F., Aurelle, H., Dénarié, J., y Promé, J.C., 1993.** Role of the *Rhizobium meliloti nodF* and *nodE* genes in the biosynthesis of lipo-oligosaccharide nodulation factors. J. Biol. Chem. **268**: 20134-20142.

**Demont, N., Ardourel, M., Maillet, F., Promé, D., Ferro, M., Promé, J., y Dénarié, J., 1994.** The *Rhizobium meliloti* regulatory *nodD3* and *syrM* genes control the synthesis of a particular class of nodulation factors *N*-acylated by ( $\omega$ -1)-hydroxylated fatty acids. EMBO J. **13**: 2139-2149.

**Denarié, J., Truchet, G., y Bergeron, B., 1976.** Effects of some mutations on symbiotic properties of *Rhizobium*. En: Symbiotic nitrogen fixation in plants. P.S.Nutman(ed). Cambridge Univ. Press, pp.47-62.

**Denarié, J., Debellé, F., y Rosenberg, C., 1992.** Signaling and host range variation in nodulation. Annu. Rev. Biochem. **65**: 497-531.

**Denarié, J., Debellé, F., y Promé, J.C., 1996.** *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. Annu. Rev. Biochem. **65**: 503-535.

**D'Haese, W., Van Montagu, M., Promé, J-C., y Holsters, M., 1999.** Carbamoylation of Azorhizobial Nod factors is mediated by NodU. Mol. Plant-Microbe Interact. **12**(1): 68-73.

- Díaz, C.L., Logman, T.J.J., Stam, H.C., y Kijne, J.W., 1996.** Sugar-binding activity of pea lectin expressed in white clover hairy roots. *Plant Physiol.* **109**: 1167-1177.
- Dickstein, R., Scheirer, D.C., Fowle, W.H., y Ausubel, F.M., 1991.** Nodules elicited by *Rhizobium meliloti* heme mutants are arrested at an early stage of development. *Mol. Gen. Genet.* **230**: 423-432.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., y Helinski, D.R., 1980.** Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria. Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**:7347-7351.
- Djordjevic, M.A., Redmond, J.W., Batley, M., y Rolfe, B.G., 1987.** Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress *nod* gene expression in *Rhizobium trifolii*. *EMBO J.* **6**: 1173-1179.
- Djordjevic, S.P., Weinman, J.J., Redmond, J.W., Djordjevic, M.A., y Rolfe, B.C., 1996.** The addition of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-ribose to nodulation-defective purine auxotrophs of NGR234 restores bacterial growth but leads to novel root outgrowths on siratro. *Mol. Plant-microbe Interact.* **9**: 114-124.
- Dowling, D.N., y Broughton, W.J., 1986.** Competition for nodulation of legumes. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**: 131-157.
- Downie, J.A., 1989.** The *nodL* gene from *Rhizobium leguminosarum* is homologous to the acetyl transferases encoded by *lacA* and *cysE*. *Mol. Microbiol.* **3**: 1649-1651.
- Downie, J.A., y 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., 1998.** Functions of rizobial nodulation genes. *The Rhizobiaceae. Molecular biology of model plant-associated bacteria.* Spaink, H.P., Kondorosi, A., y Hooykaas, P.J.J. (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos. pp 387-416.
- Dusha, I., Bakos, A., Kondorosi, A., de Bruijn, F.J., y Schell, J., 1989.** The *Rhizobium meliloti* early nodulation genes (*nodABC*) are nitrogen regulated: Isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on alfalfa in the presence of ammonium. *Mol. Gen. Genet.* **219**: 89-96.
- Dusha, I., y Kondorosi, A., 1993.** Genes at different regulatory levels are required for the ammonia control of nodulation in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **240**: 435-444.
- Dusha, I., Austin, S. y Dixon, R., 1999.** The upstream region of the *nodD3* gene of *Sinorhizobium meliloti* carries enhancer sequences for the transcriptional activator NtrC. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**: 491-499.
- Dylan, T., Ielpi, L., Stanfield, S., Kashyap, L., Douglas, C., Yanofsky, M., Nester, E., Helinski, D.R., y Ditta, G., 1986.** *Rhizobium meliloti* genes required for nodulation are

related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **83**: 4403-4407.

**Dylan, T., Helinski, D.R., y Ditta, G.S., 1990a.** Hypoosmotic adaptation in *R. meliloti* requires  $\beta$ -(1,2)-glucans. J. Bacteriol. **172**(3): 1400-1408.

**Dylan, T., Nagpal, P., Helinski, D.R., y Ditta, G.S., 1990b.** Symbiotic pseudorevertants of *R. meliloti ndv* mutants. J. Bacteriol. **172**(3): 1409-1417.

**Economou, A., Davies, A.E., Johnston, A.W.B., y Downie, J.A., 1994.** The *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae nodO* gene can enable a *nodE* mutant of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* to nodulate vetch. Microbiology. **140**: 2341-2347.

**Ehrhardt, D.W., Atkinson, E.M., y Long, S.R., 1992.** Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti*. Science. **256**: 998-1000.

**Ehrhardt, D.W., Wais, R., y Long, S.R., 1996.** Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. Cell. **85**: 673-681.

**Evans, H.J., Purohit, K., Cantrell, M.A., Eisenbrenner, G., y Russel, S.A., 1981.** Hydrogen losses and hydrogenases in nitrogen fixing organisms. In current perspectives in nitrogen fixation. Gibson, A.H. and Newton, W.E. (Ed.). Canberra, Australia. pp. 84-97.

**Farfán, M.J., Martín Rendón, E. y Calderón, I.L., 1996.** Effect of gene amplification on threonine production by yeast. Biotechnol Bioengin **49**: 667-674.

**Fellay, R., Rochepeau, P., Relic, B., y Broughton, W.J., 1995.** Signals to and emanating from *Rhizobium* largely control symbiotic specificity. En: Pathogenesis and host-parasite specificity in plant diseases. Histopathological, biochemical, genetic and molecular bases. Singh, U.S., Singh, R.P., y Kohmoto, K. (eds). Pergamon/Elsevier Science Ltd, Oxford, Reino Unido. pp 199-220.

**Fellay, R., Hanin, M., Montorzi, G., Frey, J., Freiberg, C. Golinowski, W., Staehelin, C., Broughton, W.J. y Jabbouri., 1998.** NodD2 of *Rhizobium sp.* NGR234 is involved in the repression of the *nodABC* operon. Mol. Microbiol. **27**(5): 1039-1050.

**Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi A., y Schultze, M., 1995.** Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitooligosaccharides. Plant J. **7**: 939-947.

**Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi A., y Schultze, M., 1996.** Rapid alkalization in alfalfa root hairs in response to rhizobial lipochitooligosaccharide signals. Plant J. **10**: 295-301.

**Firmin, J.L., Wilson, K.E., Carlson, R.W., Davies, A.E., y Downie, J.A., 1993.** Resistance to nodulation of cv. Afghanistan peas is overcome by *nodX*, which mediates an *O*-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipo-oligosaccharide nodulation factor. Mol. Microbiol. **10**: 351-360.

- Fisher, R.F., Egelhoff, T.T., Mulligan, J.T., y Long, S.R. 1988.** Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free extracts containing NodD to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. *Gene & Development*. **2**:282-293.
- Fisher, R.F., y Long, S.R., 1989.** DNA footprint analysis of the transcriptional activator proteins NodD1 and NodD3 on inducible *nod* gene promoters. *J. Bacteriol.* **171**(10): 5492-5502.
- Fisher, R.F., y Long, S.R., 1993.** Interactions of NodD at the nod box: NodD binds to two distinct sites on the same face of the helix and induces a bend in the DNA. *J. Mol. Biol.* **233**: 336-348.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W.J., Rosenthal, A. y Perret, X., 1997.** Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature*. **387**: 394-401.
- Garcia, M., Dunlap, J., Loh, J., y Stacey, G., 1996.** Phenotypic characterization and regulation of the *nolA* gene of *B. japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**:625-635
- García de los Santos, A., y Brom, S., 1997.** Characterization of two plasmid-borne *lps*  $\beta$  loci of *R. etli* required for lipopolysaccharide synthesis and for optimal interaction with plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**(7): 891-902.
- Gaworzewska, E.T., y Carlile, M.J., 1982.** Positive chemotaxis of *R. leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 1179-1188.
- Geelen, D., Mergaert, P., Geremia, R.A., Goormachtig, S., Van Montagu, M., y Holsters, M., 1993.** Identification of *nodSUIJ* genes in *nod* locus 1 of *Azorhizobium caulinodans*: evidence that *nodS* encodes a methyltransferase involved in Nod factor modification. *Mol. Microbiol.* **9**: 145-154.
- Geelen, D., Leyman, B., Mergaert, P., Klarskov, K., Van Montagu, M., Geremia, R.A., y Holsters, M., 1995.** NodS is an S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase that methylates chitooligosaccharides deacetylated at the non-reducing end. *Mol. Microbiol.* **17**: 387- 399.
- Geiger, O., Thomas-Oates, J.E., Glushka, J., Spaink, H.P., y Lugtenberg, B.J.J., 1994.** Phospholipids of *Rhizobium* contain *nodE* determined highly unsaturated fatty acid moieties. *J. Biol. Chem.* **269**: 11090-11097
- George, M.L., y Robert, F.M., 1991.** Autoregulatory response of *Phaseolus vulgaris* L. to symbiotic mutants of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2687-2692.
- Geremia, R.A., Cavaignac, S., Zorreguieta, A., Toro, N., Olivares, J., y Ugalde R.A. 1987.** A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharide but fails to form beta-(1-2) glucan. *J. Bacteriol.* **169**: 880-884.

- Geremia, R.A., Mergaert, P., Geelen, D., van Montagu, M., y Holster, M., 1994.** The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an *N*-acetylglucosaminyltransferase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**:2669-2673
- Glazebrook, J., y Walker, G.C., 1989.** A novel exopolisaccharide can function in place of the Calcofluor-binding exopolisaccharide in nodulation of alfalfa by *R. meliloti*. Cell. **56**(4): 661-672.
- Goethals, K., van Montagu, M., y Holsters M., 1992.** Conserved motifs in a divergent nod box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveal a common structure in promoters regulated by LysR proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **89**: 1646-1650.
- Gonzalez, J.E., Reuhs, B.L., y Walker, G.C., 1996.** Low molecular weight EPS-II of *R. meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **93**(16): 8636-8641.
- Göttfert, M., Horvath, B., Kondorosi, E., Putnoky, P., Rodriguez-Quinones, F., y Kondorosi, A., 1986.** At least two *nodD* genes are necessary for efficient nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. J. Mol. Biol. **191**:411-420.
- Göttfert, M., Grob, P., y Hennecke, H., 1990.** Proposed regulatory pathway encoded by the *nodV* and *nodW* genes, determinants of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**: 2680-2684.
- Györgypal, Z., Kiss, G.B., y Kondorosi, A. 1991.** Transduction of plant signal molecules by the *Rhizobium* NodD proteins. BioEssays **13**: 575-581.
- Hadri, A-E., y Bisseling, T., 1998.** Responses of the plant to Nod factors. En: The *Rhizobiaceae*. Molecular biology of model plant-associated bacteria. Spaink, H.P., Kondorosi, A., and Hooykaas, P.J.J. (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos. pp 403-416.
- Hadri, A-E., Spaink, H.P., Bisseling, T., y Brewin, N.J., 1998.** Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. En: The *Rhizobiaceae*. Molecular biology of model plant-associated bacteria. Spaink, H.P., Kondorosi, A., and Hooykaas, P.J.J. (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos. pp 347-360.
- Hailiang, H., Liu, S., Yang, Y., Chang, W., y Hong, G., 2000.** In *Rhizobium leguminosarum*, *nodD* represses its own transcription by competing with RNA polymerase for binding sites. Nucl. Acids Res. **28**(14): 2784-2793.
- Hartwig, U.A., Maxwell, C.A., Joseph, C.M., y Phillips, D.A., 1990.** Effects of alfalfa *nod* gene-inducing flavonoids on *nodABC* transcription in *Rhizobium meliloti* strains containing different *nodD* genes. J. Bacteriol. **172**:2769-2773.
- Hartwig, U.A., y Phillips, D.A., 1991.** Release and modification of *nod*-gene-inducing flavonoids from alfalfa seeds. Plant Physiol. **95**: 804-807.

- Heidstra, R., Kozik, A., Bisseling, T., y Lie, T.A., 1993.** Pea Nod<sup>-</sup> mutants and Nod factor perception. *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers, 267-268.
- Heidstra, R., Geurts, R., Franssen, H., Spaik, H.P., van Kammen, A., y Bisseling, T., 1994.** Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol.* **105**: 787-797.
- 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 tip growth. *Development.* **124**: 1781-1787.
- Hervás, A., 1988.** Selección de razas de *Rhizobium leguminosarum* y su tolerancia al nitrógeno combinado en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.
- Hirsch, A.M., y Smith, C.A., 1987.** Effects of *Rhizobium meliloti nif* and *fix* mutants on alfalfa root nodule development. *J. Bacteriol.* **169**: 1137-1146.
- Hirsch, A.M., 1992.** Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* **122**: 211-237.
- Hirsch, P.R., 1996.** Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. *New Phytol.* **133**: 159-171.
- Ho, S-C., Wang, J.L., Schindler, M., y Loh, J., 1993.** En: *New horizons in nitrogen fixation*. Palacios, P., Mora, J., y Newton, W.E. (eds). Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Países Bajos. p 237.
- Honma, M.A., y Ausubel, F.M., 1987.** *Rhizobium meliloti* has three functional copies of the *nodD* symbiotic regulatory gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:8558-8562.
- Honma, M.A., Asomaning, M., y Ausubel, F.M., 1990.** *Rhizobium meliloti nodD* genes mediate host-specific activation of *nodABC*. *J. Bacteriol.* **172**:901-911.
- Horvath, B., Bachem, C.W.B., Scell, J., y Kondorosi, A., 1987.** Host-specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant signal interacting with the *nodD* gene product. *EMBO J.* **6**: 841-848.
- Hoying, J.B., Behm, S.M., y Lang-Unnasch, N., 1990.** Cloning and characterization of *Rhizobium meliloti* loci required for symbiotic root nodule invasion. *Mol. Plant-Microbe Interactions.* **3**: 18-27.
- Hu, H., Liu, S., Yang, Y., Chang, W., Hong, G., 2000.** In *R. leguminosarum*, NodD represses its own transcription by competing with RNA polymerase for binding sites. *Nucl. Acids Res.***28**: 2784-2793.

- Jabbouri, S., Fellay, R., Talmont, F., Kamalaprija, P., Burger, U., Relic, B., Promé, J.C., y Broughton, W.J., 1995.** Involvement of *nodS* in *N*-methylation and *nodU* in 6-*O*-carbamoylation of *Rhizobium* sp NGR234 Nod factors. *J. Biol. Chem.* **270**: 22968-22973.
- Jiménez-Zurdo, J.I., García-Rodríguez, F.M., y Toro, N., 1997.** The *Rhizobium meliloti* *putA* gene: its role in the establishment of the symbiotic interaction with alfalfa. *Mol. Microbiol.* **23**: 85-93.
- John, M., Röhring, H., Schmidt, J., Wieneke, U., y Schell, J., 1993.** *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitoooligosaccharide deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 625-629.
- Journet, E.P., Pichon, M., Dedieu, A., De Billy, F., Truchet, G. y Barker, D., 1994.** *Rhizobium meliloti* Nod factors elicit cell-specific transcription of the *ENOD12* gene in transgenic alfalfa. *Plant J.* **6**: 241-249.
- Kaiser, B.N., Finnegan, P.M., Tyerman, S.D., Whitehead, L.F., Bergersen, F.J., Day, D.A., y Udvardi, M.K., 1998.** Characterization of an ammonium transport protein from the peribacteroid membrane of soybean nodules. *Science.* **281**: 1202-1206.
- Kamst, E., van der Drift, K.M.G.M., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J.J., y Spaink, H.P., 1995.** Mass spectrometric analysis of chitin oligosaccharides produced by *Rhizobium* NodC protein in *E. coli*. *J. Bacteriol.* **177**: 6282-6285.
- Kamst, E., Pilling, J., Raamsdonk, L.M., Lugtenberg, B.J.J., y Spaink, H.P., 1997.** *Rhizobium* nodulation protein NodC is an important determinant of chitin oligosaccharide chain length in Nod factor biosynthesis. *J. Bacteriol.* **179**: 2103-2108.
- Kapulnik, Y., Joseph, C.M., y Phillips, D.A., 1987.** Flavone limitations to root nodulation and symbiotic nitrogen fixation in alfalfa. *Plant Physiol.* **84**: 1193-1196.
- Kerppola, T.K., y Kahn, M.L., 1988.** Symbiotic phenotypes of auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* 104A14. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 913-919.
- Kijne, J.W., 1992.** The *Rhizobium* infection process. En: Biological nitrogen fixation. Stacey, G., Burris, R., y Evans, H.(eds). Chapman y Hall, Nueva York. pp 349-398.
- Kijne, J.W., Bauchrowitz, M.A., y Díaz, C.L., 1997.** Root lectins in rhizobia. *Plant Physiol.* **115**: 869-873.
- King, N.D., Hojnacki, D., y O'Brian, M.R., 2000.** The *B. japonicum* proline biosynthesis gene *proC* is essential for symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5469-5471.
- Kirkpatrick, C.R., y Schimmel, P., 1995.** Detection of leucine-independent DNA site occupancy of the yeast Leu3p transcriptional activator in vivo. *Mol. Cel. Biol.* **15**:4021-4030.

- Kiss, E., Mergaert, P., Olàh, B., Kereszt, A., Staehelin, C., Davies, A.E., Downie, J.A., Kondorosi, A., y Kondorosi, E., 1998.** Conservation of *nolR* in the *Sinorhizobium* and *Rhizobium* genera of the Rhizobiaceae family. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**(12): 1186-1195.
- Kohlhaw, G.B., 1988.** Alpha-isopropylmalate synthase from yeast. *Methods Enzymol.* **166**: 414-423.
- Kondorosi, E., Banfalvi, Z., y Kondorosi, A., 1984.** Physical and genetics analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: identification of nodulation genes. *Mol. Gen. Genet.* **193**: 445-452.
- Kondorosi, E., Gyuris, J., Schmidt, J., John, M., Duda, E., Hoffman, Schell, J., y Kondorosi, A., 1989.** Positive and negative control of *nod* gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. *EMBO J.* **8**: 1331-1340.
- Kondorosi, E., Buiré, M., Cren, M., Iyer, N., Hoffman, B., Schell, J., y Kondorosi, A., 1991a.** Involvement of *syrM* and *nodD3* gene of *Rhizobium meliloti* in *nod* gene activation and in optimal nodulation of the plant host. *Mol Microbiol.* **5**: 3035-3048
- Kondorosi, E., Pierre, M., Cren, M., Haumann, U., Buiré, M., Hoffmann, B., Schell, J., y Kondorosi, A., 1991.** Identification of *NolR* a negative transacting factor controlling the *nod* regulon in *R. meliloti*. *J. Mol. Biol.* **222**: 885-896.
- Kouchi, H., y Hata, S., 1993.** Isolation and characterization of novel cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. *Mol. Gen. Genet.* **238**: 106-119.
- Kurkdjian, A.C., 1995.** Role of the differentiation of root epidermal cells in Nod factor (from *Rhizobium meliloti*)-induced root-hair depolarization of *Medicago sativa*. *Plant Physiol.* **107**: 783-790.
- Landick, R., Turnbough, C.L.Jr., y Yanofsky, C., 1996.** Transcription attenuation. *Escherichia coli* and *Salmonella*, cellular and molecular biology. 2<sup>a</sup> Edición. F.C. Neidhardt (Ed) ASM Press (Washington, D.C). Capítulo **81**:1263-1286.
- Lederberg, E.M., y Cohen, S.N., 1974.** Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* **119**:1072-1074.
- Leigh, J.A., y Walker, G.C., 1994.** Exopolysaccharide of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends Genet.* **10**: 63-67.
- Leonard, L.T., 1943.** A simple assembly for use in testing of culture of rhizobia. *J. Bacteriol.* **45**:523-527.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.C., y Denarié, J., 1990.** Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature.* **344**: 781-784.

- Lewis-Henderson, W.R., y Djordjevic, M.A., 1991.** *nodT*, a positively acting cultivar specificity determinant controlling nodulation of *Trifolium subterraneum* by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Plant Mol. Biol.* **16**: 515-526.
- Long, S.R., 1989.** Rhizobium genetics. *Annu. Rev. Genet.* **23**: 483-506.
- Long, S.R., 1996.** *Rhizobium* symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell.* **8**: 1885-1898.
- Lopez, J.C., Grasso, D.H., Frugier, M., Crespi, y Aguilar, O.M., 2000.** Molecular characterization of the medicago sativa response to infection with *S. meliloti ilvC* mutants. Fourth European nitrogen Fixation conference. Sevilla 2000. p.177.
- López-Lara, I.M., Blok-Tip, L., Quinto, C., García, M.L., Stacey, G., Bloemberg, G.V., Lamers, G.E.M., Lugtenberg, B.J.J., Thomas-Oates, J.E., y Spaink, H.P., 1996.** NodZ of *Bradyrhizobium* extends the nodulation host range of *Rhizobium* by adding a fucosyl residue to nodulation signals. *Mol. Microbiol.* **21**: 397-408.
- Luka, S., Sanjuan, J., Carlson, R.W., y Stacey, G., 1993.** *nolMNO* genes of *Bradyrhizobium japonicum* are co-transcribed with *nodYABCSUIJ*, and *nolO* is involved in the synthesis of the lipo-oligosaccharide nodulation signals. *J. Biol. Chem.* **268**: 27053-27059.
- Maillet, F., Debelle, F., y Denarié, J., 1990.** Role of the *nodD* and *syrM* genes in the activation of the regulatory gene *nodD3*, and of the common and host-specific *nod* genes of *R. meliloti*. *Mol. Microbiol.* **4**: 1975-1984.
- Marie, C., Plaskitt, K.A., y Downie, J.A., 1994.** Abnormal bacteroid development in nodules induced by a glucosamine synthase mutant of *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**: 482-487.
- Martínez-Abarca, F., Herrera-Cervera, J.A., Bueno, P., Sanjuan, J., Bisseling, T., y Olivares, J., 1998.** Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**(2): 153-155.
- Mathesius, U., Schlaman, H.R.M., Spaink, H.P., Sautter, C., Rolfe, B.G., y 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.
- Matvienko, M., van de Sande, K., Yang, W.C., van Kammen, A., Bisseling, T., y Franssen, H., 1994.** Comparison of soybean and pea ENOD40 cDNA clones representing genes expressed during both early and late stages of nodule development. *Plant Mol. Biol.* **26**: 487-493.
- McKay, I.A., y Djordjevic, M.A., 1993.** Production and excretion of Nod metabolites by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* are disrupted by the same environmental factors that reduce nodulation in the field. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3385-3392.

- Meade, H.M., Long, S.R., Ruvkun, G.B., Brown, S.E. y Ausubel, F.M. 1982.** Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.* 149: 114-122.
- Meinhardt, L.W., Krishnan, H.B., Balatti, P.A., y Puepkke, S.G., 1993.** Molecular cloning and characterization of a Sym plasmid locus that regulates cultivar-specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. *Mol. Microbiol.* 9: 17-29.
- Mergaert, P., van Montagu, M., Promé, J-C., y Holsters, M., 1993.** Three unusual modifications, a *D*-arabinosyl, an *N*-methyl, and a carbamoyl group, are present on the Nod factors of *Azorhizobium caulinodans* strain ORS571. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 1551-1555.
- Mergaert, P., D’Haeze, W., Fernández-López, M., Geelen, D., Goethals, K., Promé, J.-C., van Montagu, M., y Holsters, M., 1995.** Biosynthesis of *Azorhizobium caulinodans* Nod factors: study of the activity of the NodABC proteins by expression of the genes in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270: 29217-29223.
- Mergaert, P., D’Haeze, W., Fernández-López, M., Geelen, D., Goethals, K., Promé, J.C., y Holsters, M., 1996.** Fucosylation and arabinosylation of Nod factors in *Azorhizobium caulinodans*: involvement of *nolK*, *nodZ* as well as *noeC* and/or downstream genes. *Mol. Microbiol.* 21: 409-419.
- Mergaert, P., Ferro, M., D’Haeze, W., Van Montagu, M., Holsters, M., y Promé, J.C. 1997.** Nod factors of *A. caulinodans* strain ORS571 can be glycosylated with an arabinosyl group, a fucosyl group, or both. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 683-687.
- Miller, J.H., 1972.** Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Miller, D., de Ruijter., y Emons AM., 1997. **From signal to form: aspects of the cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in root hair tips.** *J. Exp. Bot.* 48: 1881-1896.
- Miller, D., de Ruijter, N., Bisseling, T., y Emons, A.M., 1999.** The role of actin in root hair morphogenesis: studies with lipochito-oligosaccharide as a growth stimulator and cytochalasin as an actin perturbing drug. *Plant J.* 17(2): 141-154.
- Mulligan, J.T., y Long, S.R., 1985.** Induction of *Rhizobium meliloti nodC* expression by plant exudate requires *nodD*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 6609-6613.
- Mulligan, J.T., y Long, S.R., 1989.** A family of activator genes regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Genetics.* 122: 7-18.
- Muñoz, J.A., Palomares, A.J., y Ratet, P., 1996.** Plant genes induced in the *Rhizobium-legume* symbiosis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 189-202.

- Newman, J.D., Diebold, R.J., Schultz, B.W., y Noel, K.D., 1994. Infection of soybean and pea nodules by *Rhizobium* spp. purine auxotrophs in the presence of 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside. *J. Bacteriol.* **176**: 3286-3294.
- Niehaus, K., Kapp, D., y Pülher, A., 1993. Plant defence and delayed infection alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS-I)-deficient *R. meliloti* mutant. *Plant.* **190**(4): 415-425.
- Niehaus, K., Albus, U., Baier, R., Schiene, K., Schröder, S., y Püler, A., 1998. Symbiotic suppression of the *Medicago sativa* plant defence system by *R. meliloti* oligosaccharides. In *Biological Nitrogen Fixation for the 21<sup>st</sup> century*. Kluwer Acad. Publishers. pp 225-226.
- Niner, M.B., y Hirsch, M., 1998. How many *Rhizobium* Genes, in addition to *nod*, *nif/fix*, and *exo*, are needed for nodule development and function?. *Symbiosis.* **24**:51-102
- Noel, K.D., VandenBosch, K.A., y Kulpaca, B., 1986. Mutations in *R. phaseoli* that lead to arrested development of infection threads. *J. Bacteriol.* **168**(3):1392-1401.
- Noel, K.D., Diebold, R.J., Cava, J.R., y Brink, B.A., 1988. Rhizobial purine and pyrimidine auxotrophs: nutrient supplementation, genetic analysis and the symbiotic requirement for *de novo* purine biosynthesis. *Arch. Microbiol.* **149**: 499-506.
- Olivares, J., Casadesus, J., y Bedmar, E.J. 1980. Method for testing degree of infectivity of *Rhizobium meliloti* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**:967-970.
- Ollero, F.J., Moussaid, A., Moreno, F.J., Torres, A., Ruiz-Sainz, J.E., y Buendia-Claveria, A., 2000. An uracile auxotroph (*pyrf*) mutant of *S. fredii* HH103 is severely impaired for nodulation and symbiotic nitrogen fixation ability. Libro de resúmenes Fourth European nitrogen Fixation conference. Sevilla 2000. p.196.
- Ogawa, J., y Long, S.R., 1995. The *Rhizobium meliloti groELc* locus is required for regulation of early *nod* genes by the transcription activator NodD. *Genes Dev.* **9**:714-729.
- Pearson, W.R., y Lipman, D.J., 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**:2444-2448.
- Penmetsa, R.V., y Cook, D.R., 1997. A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science.* **275**: 527-530.
- Perotto, S., Brewin, N.J., y 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.
- Peters, M.H., Beltzer, J.P., y Kohlhaw, G.B., 1990. Expression of the yeast *LEU4* gene is subject to four different modes of control. *Arch. Biochem. Biophys.* **276**: 294-298.

- Peters, N.K., 1997.** Nodulation: finding the lost common denominator. *Curr Biol.* **7**: 223-226.
- Prentki, P., y Krisch, H.M. 1984.** *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene.* **29**: 303-312.
- Price, N.P.J., Relic, B., Talmont, F., Lewin, A., Promé, D., Pueppke, S.G., Maillet, F., Denarié, J., Promé, J.C., y Broughton, W.J., 1992.** Broad-host-range *Rhizobium* species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are *O*-acetylated or sulphated. *Mol. Microbiol.* **6**: 3575-3584.
- Quinto, C., Wijfjes, A.H.M., Bloemberg, G.V., Blok-Tip, L., López-Lara, I.M., Lugtenberg, B.J.J., Thomas-Oates, J.E., y Spaink, H.P., 1997.** Bacterial nodulation protein NodZ is a chitin oligosaccharide fucosyltransferase which can also recognize related substrates of animal origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 4336-4341.
- Reichenbecher, V.E., Fischer, Jr., y Gross, S.R., 1978.** Regulation of isopropylmalate isomerase synthesis in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **133**:794-801.
- Reuhs, B.L., Williams, M.N.V., Kim, J.S., Carlson, R.W., y Cote, F., 1995.** Suppression of the Fix<sup>-</sup> phenotype of *Rhizobium meliloti* *exoB* mutants by *lpsZ* is correlated to a modified expression of the K polysaccharide. *J. Bacteriol.* **177**: 4289-4296.
- Relic, B., Talmont, F., Kopcinska, J., Golinowski, W., Promé, J-C., y Broughton, W.J., 1993.** Biological activity of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod-factors on *Macroptilium atropurpureum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**:764-774.
- Rigaud, J., y Puppo, A., 1975.** Indole-3 acetic catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Bacteriol.* **88**:223-228.
- Ritsema, T., Wijfjes, A.H.M., Lugtenberg, B.J.J., y Spaink, H.P., 1996.** *Rhizobium* nodulation protein NodA is a host specific determinant of the transfer of fatty acids in Nod factor biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* **251**: 44-51.
- Rivilla, R., y Downie, J.A., 1994.** Identification of a *Rhizobium leguminosarum* gene homologous to *nodT* but located outside the symbiotic plasmid. *Gene* **144**: 87-91
- Robertsen, B.K., Aiman, P., Darvill, A.G., Mcneil, M., y Albersheim, P. 1981.** The structure of acidic extracellular polysaccharides secrete by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant. Physiol.* **67**:389-400.
- Roche, P., Debelle, F., Maillet, F., Lerouge, P., Faucher, C., Truchet, G., Denarié, J., y Promé, J.C., 1991.** Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* y *nodPQ* genes encode the sulfation of lipooligosaccharide signals. *Cell.* **67**: 1131-1143.

- Roche, P., Maillet, F., Plazenet, C., Debelle, F., Ferro, M., Truchet, G., Promé, J.C., y Denarie, J., 1996.** The common *nodABC* genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 15305-15310.
- Rodríguez, R.L., y Tait, R.C., 1983.** Recombinant DNA techniques. Addison-Wesley Publishing.
- Röhrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U., Kondorosi, E., Barlier, I., Schell, J., y John, M., 1994.** Biosynthesis of lipooligosaccharide nodulation factors: *Rhizobium* NodA protein is involved in *N*-acylation of the chitooligosaccharide backbone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 3122-3126.
- Rossbach, S., y Hennecke, H., 1991.** Identification of *glyA* as a symbiotically essential gene in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Microbiol.* **5**: 39-47.
- Rossen, L., Shearman, C.A., Johnston, A.W.B., y Downie, J.A., 1985.** The *nodD* gene of *R. leguminosarum* is autoregulatory and in the presence of plant exudate induces the *nodA*, *B*, *C* genes. *EMBO J.* **4**: 3369-3373.
- Ruiz Argüeso, T., Hanus, F.J., y Evans, H.J., 1978.** Hydrogen production and uptake by pea nodules as affected by strains of *R. leguminosarum*. *Arch. Microbiol.* **116**: 113-118.
- Rushing, B.G., Yelton, M.M., y Long, S.R., 1991.** Genetic and physical analysis of the *nodD3* region of *Rhizobium meliloti*. *Nucl. Acids Res.* **19**: 921-927.
- Sadowsky, M.J., Rostas, K., Sista, P.R., Bussey, H., y Verma, D.P.S., 1986.** Symbiotically defective histidine auxotrophs of *B. japonicum*. *Arch. Microbiol.* **144**: 334-339.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. 1989.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Sanjuan, J., Carlson, R.W., Spaink, H.P., Bhat, U.R., Barbour, W.M., Glushka, J., y Stacey, G., 1992.** A 2-*O*-methylfucose moiety is present in the lipo-oligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 8789-8793.
- Sanjuan, J., Grob, P., Göttfert, H.H., y Stacey, G., 1994.** NodW is essential for full expression of the common nodulation genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**: 364-369.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., y Pühler, A., 1994.** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene.* **145**: 69-73.
- Schell, M.A., 1993.** Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**: 597-626.

- Scheres, B., van de Wiel, C., Zalensky, A., Horvath, B., Spaink, H.P., van Eck, H., Zwartkruis, F., Wolters, A-M. Gloudemans, T., van Kammen, A., y Bisseling, T. 1990a. The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the pea-*Rhizobium* interaction. *Cell*. **60**: 281-294.
- Scheres, B., van Engelen, F., van der Knaap, E., van de Wiel, C., van Kammen, A., y Bisseling, T., 1990. Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell*. **2**: 687-700.
- Schlaman, H.R.M., Horvath, B., Vijgenboom, E., Okker, R.J.H., y Lugenberg, B.J.J., 1991. Suppression of nodulation gene expression in bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *J. Bacteriol*. **173**: 4277-4287.
- Schlaman, H.R.M., Lugtenberg, B.J.J., y Okker, R.J.H., 1992a. The NodD protein does not bind to the promoters of inducible nodulation genes in extracts of bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *J. Bacteriol*. **174**: 6109-6116.
- Schlaman, H.R.M., Okker, R.J.H., y Lugtenberg, B.J.J., 1992b. Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia. *J. Bacteriol*. **174**: 5177-5182.
- Schlaman, H.R.M., Phillips, D.A., y Kondorosi, E., 1998. Genetic organization and transcription regulation of rhizobial nodulation genes En: *The Rhizobiaceae*. Molecular biology of model plant-associated bacteria. Spaink, H.P., Kondorosi, A., y Hooykaas, P.J.J. (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos. pp 361-386.
- Schultze, M., Quiclet-Sire, B., Kondorosi, E., Virelizier, H., Glushka, J.N., Endre, G., Géro, S.D., y Kondorosi, A., 1992. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipooligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**: 192-196.
- Schwedock, J., y Long, S.R., 1989. Nucleotide sequence and protein products of two new nodulation genes of *R. meliloti*, *nodP* and *nodQ*. *Mol. Plant-Microbe Interact*. **2**:181-194.
- Scott, D.B., Young, C.A., Collings-Emerson, J.M., Terzaghi, E.A., Rockman, E.S., Lewis, P.E., y Pankhurst, C.E., 1996. Novel and complex chromosomal arrangement of *R. loti* nodulation genes. *Mol. Plant-Microbe Interact*. **9**: 187-197.
- Simon, R., Prierer, U., y Pühler, A., 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Biotechnology*. **1**: 784-791.
- Smit, G., Kijne, J.W., y Lugtenberg, B.J.J., 1987. Both cellulose fibrils and a Ca<sup>2+</sup>-dependent adhesin are involved in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *J. Bacteriol*. **169**: 4294-4301.
- Smit, G., Puvanesarajah, V., Carlson, R. W., Barbour, W. M., y Stacey, G., 1992. *Bradyrhizobium japonicum nodD1* can be specifically induced by soybean flavonoids that do not induce the *nodYABCSUIJ* operon. *J. Biol. Chem*. **267**: 310-318.

- Smit, G., De Koster, C.C., Schripsema, J., Spaink, H.P., Van Brussel, A.A. and Kijne, J.W., 1995.** Uridine, a cell division factor in pea roots. *Plant Mol. Biol.* **29**: 869,873.
- Somers, J.M., Amzallag, A., y Middlenton, R.B., 1973.** Genetic fine structure of the leucine operon of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **113**(3):1268-1272.
- Soto, M.J., Lepek, V., Lopez-Lara, I.M., Olivares, J., y Toro, N., 1992.** Characterization of a *R. meliloti ndv* mutant and a symbiotic revertant that regains wild-type properties. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**(4): 288-293.
- Southern, E.M., 1975.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.
- Spaink, H.P., Wijffelman, C.A., Pees, E., Okker, R.J.H., y Lugtenberg, B.J.J., 1987.** *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature.* **328**: 337-340.
- Spaink, H.P., Okker, R.J.G., Wijffelman, C.A., Pees, E., y Lugtenber, B.J.J., 1987a.** Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol. Biol.* **9**: 27-39.
- Spaink, H.P., Okker, R.J.H., Wijffelman, C.A., Tak, T., y Roo, L.G., 1989.** Symbiotic properties of rhizobia containing a flavonoid-independent hybrid *nodD* product. *J. Bacteriol.* **171**: 4045-4053.
- Spaink, H.P., Geiger, O., Sheeley, D.M., van Brussel, A.A.N., York, W.S., Reinhold, W.N., Lugtenberg, B.J.J., y Kennedy, E.P., 1991a.** The biochemical function of *Rhizobium leguminosarum* proteins involved in the production of host-specific K signal molecules. En: *Molecular genetics of plant-microbe interactions*. Hennecke, H., y Verma, D.S.P. (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-Londres. pp 142-149.
- Spaink, H.P., Sheeley, D.M., van Brussel, A.A.N., Glushka, J., York, W.S., Tak, T., Geiger, O., Kennedy, E.P., Reinhold, V.N., y Lugtenberg, B.J.J., 1991b.** A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature.* **354**: 125-130.
- Spaink, H.P., Wijfjes, A.H., van der Drift, K. M., Haverkramp, J., Thomas-Oates., y Lubtemberg, B.J., 1994.** Structural identification of metabolites produced by the NodB and NodC proteins of *R. leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* **13**: 821-831.
- Spaink, H.P., 1995.** The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: the ins and outs of symphogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**: 345-368.
- Spaink, H.P., Bloemberg, G.V., van Brussel, A.A.N., Lugtenberg, B.J.J., van der Drift, K.M.G.M., Haverkamp, J., y Thomas-Oates, J.E., 1995a.** Host specificity of *Rhizobium leguminosarum* is determined by the hydrophobicity of highly unsaturated fatty acyl moieties of the nodulation factors. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**: 155-164.

- Spaink, H.P., Wijffjes, A.H.M., y Lugtenberg, B.J.J., 1995b.** *Rhizobium* NodI and NodJ proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides. *J. Bacteriol.* **177**: 6276-6281.
- Spaink, H.P., 1997.** Ethylene as a regulator of *Rhizobium* infection. *Trends in Plant Science Research News.* **2**(6): 203-204
- Stacey, G., So, J.S., Roth, R.E., Lakshmi, S.K., y Carlson, R.W., 1991.** A lipopolysaccharide mutant of *B. japonicum* that uncouples plant from bacterial differentiation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**(4): 332-340.
- Stacey, G., Luka, S., Sanjuan, J., Banfalvi, Z., Nieuwkoop, A.J., Chun, J.Y., Forsberg, L.S., y Carlson, R., 1994.** *nodZ*, a unique host-specific nodulation gene, is involved in the fucosylation of the lipooligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **176**: 620-633.
- Stacey, G., 1995.** *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genetics. *FEMS Microbiol. Lett.* **127**: 1-9
- Straub, P.F., Reynolds, P.H., Althomsons, S., Mett, V., Zhu, Y., Shearer, G., y Kohl, D.H., 1996.** Isolation, DNA sequence analysis, and mutagenesis of a proline dehydrogenase gene (*putA*) from *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 221-229.
- Sutton, J.M., Lea, E.J.A., y Downie, J.A., 1994.** The nodulation signaling protein NodO from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* forms ion channels in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 9990-9994.
- Surin, B.P., y Downie., 1988.** Characterization of the *Rhizobium leguminosarum* genes *nodLMN* involved in efficient host-specific nodulation. *Mol. Microbiol.* **2**: 173-183.
- Swamynathan, S.K., y Singh, A., 1992.** *R. meliloti* purine auxotrophs are Nod<sup>+</sup> but defective in nitrogen fixation. *J. Genet.* **71**: 11-21.
- Swanson, J.A., Mulligan, J.T., y Long, S.R. 1993.** Regulation of *syrM* and *nodD3* in *Rhizobium meliloti*. *Genetics.* **134**:435-444.
- Swart S., 1994.** Rhicadhesin-mediated attachment of Rhizobiaceae. PhD Thesis, Leiden University.
- Swart, S., Logman, T.J.J., Smit, G., Lugtenberg, B.J.J., y Kijne, J.W., 1994.** Purification and partial characterization of a glycoprotein from pea (*Pisum sativum*) with receptor activity for rhicadhesin, an attachment protein of *Rhizobiaceae*. *Plant Mol. Biol.* **24**: 171-183.
- Sze, J-Y., Woontner, M., Jaehning, J.A., y Kohlhaw, G.B., 1992.** In vitro transcriptional activation by a metabolic intermediate: activation by Leu3 depends on  $\alpha$ -isopropylmalate. *Science.* **258**:1143-1145.

- Tate, R., Riccio, A., Caputo E., Iaccarino M., y Patriarca EJ., 1999.** The *R. etli metZ* gene is essential for methionine biosynthesis and nodulation of *P. vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 24-34.
- Timmers, A.C.J., Soupene E., Auriac MC., De Billy, F., Vasse, J., Boistard, P., y Truchet, G., 2000.** Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 1204-1213.
- Trewavas, A.J., y Malhó, R., 1998.** Ca<sup>++</sup> signalling in plant cells: the big network. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 424-427.
- Truchet, G., Michel, M., y Dénarié, J., 1980.** Sequential analysis of the organogenesis of lucerne (*Medicago sativa*) root nodules using symbiotically-defective mutants of *Rhizobium meliloti*. *Differentiation.* 16: 163-172.
- Umbarger, H.E., 1996.** Biosynthesis of the branched-chain amino acids. *Escherichia coli* and *Salmonella*, celular and molecular biology. 2ª Edición. F.C. Neidhardt (Ed) ASM Press (Washington, D.C.) Capítulo 27: 442-457.
- van Brussel, A.A.N., Bakhuizen, R., van Spronsen, P.C., Spaink, H.P., Tak, T., Lugtenberg, B.J.J., y Kijne, J.W., 1992.** Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science.* 257: 70-71.
- van der Drift, K.M.G.M., Spaink, H.P., Bloemberg, G.V., van Brussel, A.A.N., Lugtenberg, B.J.J., Haverkamp, J., y Thomas-Oates, J.C., 1996.** *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* produces lipo-chitin oligosaccharides with *nodE*-dependent highly unsaturated fatty acyl moieties. An electrospray ionization and collision-induced dissociation tandem mass spectrometric study. *J. Biol. Chem.* 271: 22563-22569.
- van Rhijn, P., Feys, B., Verreth, C., y Vanderleyden, J., 1993.** Multiple copies of *nodD* in *Rhizobium tropici* CIAT899 and BR816. *J. Bacteriol.* 175: 438-447.
- van Rhijn, P., y Vanderleyden, J., 1995.** The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* 59: 124-142.
- van Spronsen, P.C., Bakhuizen, R., van Brussel, A.A.N., y Kijne, J.W., 1994.** Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. *Eur. J. Cell Biol.* 64: 88-94.
- van Spronsen, P.C., van Brussel, A.A.N., y Kijne, J.W., 1995.** Nod factors produced by *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* induce ethylene-related changes in root cortical cells of *Vicia sativa* ssp. *nigra*. *Eur. J. Cell Biol.* 68: 463-469.
- VandenBosch, K.A., Noel, K.D., Kaneko, Y., y Newcomb, E.H., 1985.** Nodule initiation elicited by noninfective mutants of *Rhizobium phaseoli*. *J. Bacteriol.* 162: 950-959.

**Wang, D., Hu, Y., Zheng, F., Zhou, K., y Kohlhaw, G.B., 1997.** Evidence that intramolecular interactions are involved in masking the activation domain of transcriptional activator Leu3p. *J. Biol. Chem.* **272**:19383-19392.

**Wang, D., Zheng, F., Holmberg, S., y Kohlhaw, G.B., 1999.** Yeast transcriptional regulator Leu3p: self-masking, specificity of masking, and evidence for regulation by the intracellular level of Leu3p. *J. Biol. Chem.* **274**:19017-19024.

**Wang, S.P., y Stacey, G., 1990.** Ammonia regulation of *nod* genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Gen. Genet.* **223**: 329-331.

**Wang, S-Z., Dean, D.R., Chen, J.S., y Johnson, J.L., 1991.** The N-terminal and C-terminal portions of NifV are encoded by two different genes in *Clostridium pasteurianum*. *J. Bacteriol.* **173**:3041-3046.

**Waters, J.K., Hughes, B.L 2<sup>nd</sup>., Purcell, L.C., Gerhardt, K.O., Mawhinney, T.P., y Emerich, D.W., 1998.** Alanine, not ammonia, is excreted from N<sub>2</sub>-fixing soybean nodule bacteroids. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA.* **95**(20): 12038-12042.

**Willians, M.N.V., Hollingsworth, R.I. Klein S., y Signer E.R., 1990.** The symbiotic defect of *R. meliloti* exopolysaccharide mutants is suppressed by *lpsZ*, a gene involved in lipopolysaccharide biosynthesis. *J. Bacteriol.* **172**(5): 2622-2632.

**Wilson, C.W., Long, F., Maruoka, E.M., y Cooper, J.B., 1994.** A new proline-rich early nodulin from *Medicago truncatula* is highly expressed in nodule meristematic cells. *Plant Cell.* **6**: 1265-1275.

**Wilson, K.J., Sessitsch, A., Corbo, J.C., Giller, K.E., Akkermans, A.D.L., y Jefferson, R.A., 1995.**  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiology.* **141**: 1691-1705.

**Yadav, A.S., Vashishat, R.K., Kuykendall, L.D., y F.M. Hashem., 1998.** Biochemical and symbiotic properties of histidine-requiring mutants of *R. leguminosarum* bv. trifolii. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**: 22-26.

**Yang, C., Signer E.R., y Hirsch A.M., 1992.** Nodules initiated by *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide mutants lack a discrete, persistent nodule meristem. *Plant Physiol.* **98**(1): 143-151.

Yang, W.C., Katinakis, P., Hendriks, P., Smolders, A., de Vries, F., Spee, J., van Kammen, A., Bisseling, T., y Franssen, H., 1993. Characterization of GmENOD40, a gene showing novel patterns of cell-specific expression during soybean nodule development. *Plant J.* **3**: 573-585.

**Yang, W.C., de Blank, C., Meskiene, I., Hirt, G., Bakker, J., van Kammen, A., Franssen, H., y Bisseling, T., 1994.** *Rhizobium* Nod factors reactivate the cell cycle during

infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. *Plant Cell*. **6**: 1415-1426.

**Yang, Z., 1998.** Signalling tip growth in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 525-530.

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

**Zaat, S.A.J., Wijffelman, C.A., Spaink, H.P., Van Brussel, .A.A.N., Okker, R.J.H., y Lugtemberg, B.J.J., 1987.** Induction of the *nodA* promoter of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI by plant flavanones and flavones. *J. Bacteriol.* **169**: 198-204.