

Prov. T. 14/62

T
15
36

UNIVERSIDAD DE GRANADA

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias

FACULTAD DE CIENCIAS

Fecha 8 NOV 1993
ENTRADA NUM. 1907

Caracterización de los genes *nfe* implicados en la infectividad y competitividad de *Rhizobium meliloti*.

María José Soto Misffout

TESIS DOCTORAL
1993

BIBLIOTECA	UNIVERSITARIA
GRANADA	
Nº Documento	50670734
Nº Copia	2128997

Caracterización de los genes *nfe* implicados en la infectividad y competitividad de *Rhizobium meliloti*.

Memoria que presenta la licenciada en Ciencias
Biológicas Doña María José Soto Misffout,
para aspirar al grado de Doctor.



Fdo: María José Soto Misffout

Vº Bº

El Director



Fdo.: Nicolás Toro García
Doctor en Ciencias Biológicas
Colaborador Científico del C.S.I.C.

Indice

INTRODUCCION	1
1.-Introducción	1
2.-Proceso de nodulación	2
2.1.-Colonización y quimiotaxis de la raíz	2
2.2.-Adhesión a la raíz	3
2.3.-Curvatura del pelo radical	4
2.4.-Formación del canal de infección e iniciación del nódulo	4
2.5.-Liberación de la bacteria. Diferenciación en bacteroide.	
Fijación de N ₂	5
3.-Genes bacterianos que controlan la nodulación	5
3.1.-Genes de la nodulación	6
3.1.1.-Genes comunes de la nodulación	6
3.1.2.-Genes que controlan la especificidad de hospedador	6
3.1.3.-Determinantes de nodulación específicos de un genotipo o cultivar	6
3.2.-Factores Nod	8
3.3.-Funciones bioquímicas de los genes <i>nod</i>	10
3.4.-Regulación de los genes <i>nod</i>	11
3.5.-Componentes de superficie que afectan al desarrollo del nódulo	14
3.5.1.-Polisacárido extracelular (EPS)	14
3.5.2.-Lipopolisacáridos (LPS)	16
3.5.3.-Beta Glucanos	17
4.-Control de la nodulación llevado a cabo por la planta	18
4.1.-Nodulinas	18
4.1.1.-Tipos de nodulinas	18
4.1.2.-Regulación de los genes de nodulinas	20
4.2.-Genes de la planta que afectan la nodulación	20
4.3.-Autorregulación	22
5.-La competitividad por la formación de nódulos	23
6.-Factores ecológicos que afectan la competitividad	24
6.1.-Factores ambientales	24
6.2.-Factores biológicos	26

6.3.-Otros factores: herbicidas y pesticidas	27
7.-Fenotipos y genes rizobianos implicados en la competitividad por la nodulación	27
7.1.-Antibiosis o Producción de bacteriocinas	27
7.2.-Características de la superficie celular	28
7.3.-Motilidad	29
7.4.-Velocidad de nodulación	29
7.5.-Efectividad simbiótica	29
7.6.-Genes que confieren una ventaja metabólica	29
7.7.-Genes que intervienen en la eficiencia de nodulación dependientes de <i>nifA</i>	31
7.8.-Genes dependientes de <i>nifA</i> de función desconocida	31
8.-El gen <i>nifA</i> como regulador de otros genes	32
9.-Región <i>nfe</i> de <i>R. meliloti</i> GR4	33
9.1.-Identificación de la región <i>nfe</i>	33
9.2.-Transferencia de la región <i>nfe</i> a distintas cepas de <i>R. meliloti</i>	35
10.-Secuencias de inserción en <i>Rhizobium</i>	37
MATERIAL Y METODOS	40
1.-Razas bacterianas y plásmidos	40
2.-Medios de cultivo y de conservación	40
2.1.-Medios para Rhizobiaceae	40
2.2.-Medios para <i>E. coli</i>	45
2.3.-Medios de conservación	45
3.-Antibióticos	45
4.-Selección de mutantes resistentes a antibióticos	45
5.-Ensayos con planta	46
5.1.-Planta	46
5.2.-Solución nutritiva	46
5.3.-Esterilización y germinación de semillas de alfalfa	46
5.4.-Cultivo axénico de plantas de alfalfa	46
5.5.-Inoculación de las plantas	47
5.6.-Reaislamiento de <i>Rhizobium</i> de los nódulos	47
5.7.-Medida de la competitividad para la nodulación	47
6.-Métodos de conjugación	48
6.1.-Cruces simples	48
6.2.-Cruces triparentales	48
7.-Aislamiento y purificación de ADN plasmídico	49

7.1.-Aislamiento a gran escala de plásmidos de bajo peso molecular	49
7.2.-Purificación de ADN plasmídico en gradiente de cloruro de cesio	49
7.3.-Minipreparación de plásmidos	50
7.4.-Purificación con GeneClean del ADN obtenido por Minipreps	50
7.5.-Magic Minipreps	51
8.-Aislamiento de ADN total	51
9.-Determinación de la concentración de ADN, ARN y oligonucleótidos	52
10.-Manipulación enzimática de ADN	52
10.1.-Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción	52
10.2.-Relleno de extremos 3' de fragmentos de restricción	53
10.3.-Eliminación de extremos 3' de fragmentos de restricción	53
10.4.-Ligación de fragmentos de restricción	53
11.-Electroforesis de ADN	53
11.1.-Separación e identificación de fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa	53
11.2.-Revelado de geles y fotografía	54
11.3.-Estimación de los pesos moleculares de fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa	54
11.4.-Purificación de fragmentos de restricción por transferencia desde geles de agarosa a membranas de DEAE-celulosa	54
11.5.-Purificación de fragmentos de restricción de geles de agarosa por el método "Magic PCR Preps™"	55
12.-Preparación de células competentes y transformación de <i>E. coli</i>	55
13.-Electroporación de <i>E. coli</i> y <i>Rhizobium</i>	56
13.1.-Preparación de las células de <i>E. coli</i>	56
13.2.-Preparación de las células de <i>Rhizobium</i>	56
13.3.-Electroporación	56
14.-Experimentos de hibridación ADN-ADN	57
14.1.-Transferencia de ADN a filtros de nylon	57
14.2.-Marcaje de sondas de ADN para hibridación	57
14.3.-Hibridación ADN-ADN con sonda no radiactiva	58
15.-Secuenciación de ADN de cadena doble	58
15.1.-Obtención de los plásmidos de secuenciación. Estrategia	58
15.2.-Selección y purificación de clones de secuenciación	62
15.3.-Secuenciación	63
15.3.1.-Preparación y marcaje de ADN	63
15.3.2.-Secuenciación de nucleótidos cercanos al cebador	64

15.3.3.-Secuenciación de zonas no solapadas y resolución de compresiones	64
15.3.4.-Electroforesis en gel de poliacrilamida	65
15.4.-Tratamiento del gel y exposición	65
16.-Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas	66
17.-Determinación del sitio de inicio de la transcripción	66
17.1.-Obtención de ARN total	66
17.2.-Marcaje de cebador	67
17.3.-Reacción de unión del cebador y extensión	67
18.-Detección de proteínas codificadas por la región <i>nfe</i>	68
18.1.-Síntesis <i>in vitro</i> de proteínas	68
18.2.-Síntesis <i>in vivo</i> de proteínas	69
18.3.-Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes	69
18.4.-Detección de proteínas en geles de poliacrilamida	70
19.-Identificación de nodulinas	71
19.1.-Extracción de ARN total de nódulos y tejido radical	71
19.2.-Traducción <i>in vitro</i>	71
19.3.-Electroforesis bidimensional de los productos obtenidos en la síntesis <i>in vitro</i>	72
19.3.1.-Primera dimensión	72
19.3.2.-Segunda dimensión	74
20.-Determinación de proteína	74
21.-Determinación de la actividad ornitina ciclodeaminasa (OCD)	74
22.-Determinación de actividad ornitina aminotransferasa	75
23.-Cinética enzimática de la actividad OCD	76
24.-Utilización <i>in vivo</i> de la L[1- ¹⁴ C]ornitina	76
RESULTADOS	77
1.-Secuencia de ADN de la región <i>nfe</i>	77
2.-Identificación de promotores <i>nif</i> en la región <i>nfe</i>	85
3.-Funcionalidad de los promotores <i>nif</i> de la región <i>nfe</i>	86
4.-Localización de las inserciones Tn3::HoHo1 pNTH30, pNTH56 y pNTH5.	88
5.-Localización de la inserción Tn3::HoHo1 del mutante GRS5	88
6.-Identificación en <i>E.coli</i> de los productos codificados por la región <i>nfe</i> .	89
7.-Caracterización de los ORFs identificados en la región <i>nfe</i> .	91
7.1.-Caracterización de <i>nfe1</i> y <i>nfe2</i>	91
7.1.1.-Homologías a nivel de ADN.	91

7.1.2.-Homología a nivel de secuencia de aminoácidos de las teóricas proteínas codificadas por <i>nfe1</i> y <i>nfe2</i>	91
7.2.-Caracterización del ORFA, ORFA1 y del ORFB	95
7.3.-Caracterización del ORFC	98
7.3.1.-Homología a nivel de ADN y secuencia de aminoácidos	98
7.3.2.-Secuencias relacionadas con ORFC en <i>Rhizobium</i>	100
7.4.-Caracterización del ORFD	100
7.4.1.-Secuencia de nucleótidos y homologías a nivel de secuencia de aminoácidos	100
7.4.2.-Número de copias de ISRm3	101
7.5.-Caracterización de ORF1, ORF2 y ORF3	103
7.5.1.-Secuencia de nucleótidos y homologías a nivel de secuencia de aminoácidos	103
7.5.2.-Número de copias de ISRm4	103
8.-Construcción de Rm 2034C, una cepa mutada en ORFC	104
9.-Competitividad de la cepa Rm 2034C.	105
10.-Utilización de ornitina por Rm GR4 y cepas derivadas	106
10.1.-Ensayos de actividad OCD y ornitina transaminasa en <i>Rhizobium</i>	107
10.2.-Utilización in vivo de L[1- ¹⁴ C]ornitina	
10.3.-Cinética enzimática de las actividades detectadas en extractos de GR4 y GRM8	110
11.-Actividad ornitina ciclodeaminasa (OCD) en <i>E. coli</i>	110
12.-Análisis de nodulinas asociadas a la expresión de la región <i>nfe</i>	111
DISCUSION	113
1.-Los promotores tipo <i>nif</i> de la región <i>nfe</i> .	113
2.-Límites de la región <i>nfe</i> .	116
3.-Estructura de la región <i>nfe</i> .	117
4.-Secuencias de inserción ligadas a la región <i>nfe</i> .	118
5.-Actividad ornitina ciclodeaminasa de <i>Rhizobium meliloti</i> GR4.	121
6.-Función de <i>nfe</i> en competitividad.	122
CONCLUSIONES	125
BIBLIOGRAFIA	126

INTRODUCCION

1.-Introducción.

El nitrógeno molecular (N_2) es el gas más abundante en nuestra atmósfera. Sin embargo, por su elevado carácter inerte, no resulta útil como fuente de nitrógeno para el desarrollo de los seres vivos. Sólo algunos microorganismos procariotas (diazotrofos) son capaces de transformar el dinitrógeno atmosférico en nitrógeno combinado mediante un proceso que recibe el nombre de Fijación Biológica de Nitrógeno y que es responsable de las 2/3 partes del N_2 fijado en la biosfera.

El enzima responsable de este proceso es un complejo denominado NITROGENASA formado por dos componentes (componentes I y II) que en presencia de ATP y un sistema transportador de electrones es capaz de reducir el dinitrógeno hasta amoniaco. La nitrogenasa es muy sensible al oxígeno, por lo que los distintos fijadores sólo llevan a cabo el proceso de fijación en condiciones de baja tensión de oxígeno intracelular, de ahí que la mayoría de ellos hayan desarrollado distintas estrategias para la protección de la enzima en condiciones aerobias (Gallon, 1981)

Son muchos los organismos, pertenecientes a muy diferentes grupos microbianos, en los que se ha podido detectar el carácter fijador (Young, 1992), en vida libre o en asociación con plantas. Entre estos últimos tiene especial importancia la simbiosis mutualista que se establece entre bacterias pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* conocidas como rizobios (Young y Johnston, 1989), y las plantas de la familia Fabaceae o leguminosas. La importancia de esta asociación estriba en los altos niveles de nitrógeno fijado (contribuyen con el 80% del N_2 fijado de forma estable) y en el interés de las plantas implicadas que constituyen una importante fuente de alimentación animal y humana. Esta simbiosis se caracteriza por su gran especificidad, cada rizobio interacciona con una o muy pocas especies de plantas estrechamente relacionadas.

Cuando los rizobios infectan a una leguminosa huésped, inducen la formación de un nuevo órgano, el nódulo, donde tendrá lugar la fijación biológica de N_2 que será llevada a cabo por una forma especializada de la bacteria: el bacteroide. El amonio producido será exportado a la célula hospedadora e incorporado al metabolismo de la planta.

La formación del nódulo implica un reconocimiento específico entre los componentes procariótico y eucariótico de la asociación. Este proceso conlleva cambios en la expresión de muchos genes tanto de la bacteria como de la planta. Una incorrecta comunicación en cualquier momento entre los dos socios, puede llevar a la detención y aborto del proceso simbiótico de fijación de nitrógeno.

Aunque desde hace tiempo se comercializan inoculantes biológicos muy eficientes en la fijación de nitrógeno, éstos no suelen dar buenos resultados en suelos que disponen de poblaciones autóctonas de rizobios, poco eficientes por lo general, pero que se hallan muy bien adaptados a su nicho ecológico, por lo que llegan a formar mayor porcentaje de nódulos

que la cepa introducida. Este problema al que se le conoce como competitividad por la nodulación, está siendo objeto de un intenso estudio, fundamentalmente a nivel del microsimbionte.

Si bien el conocimiento a nivel molecular de los genes bacterianos está bastante avanzado, los genes de la planta que intervienen en el establecimiento de la simbiosis son prácticamente desconocidos. Además, aún existen lagunas en lo que se refiere a cómo se lleva a cabo la comunicación de la bacteria con la planta para que ésta permita la infección y la formación del nódulo fijador. La elucidación de estas cuestiones es imprescindible para la comprensión de todo el proceso simbiótico y para un mejor aprovechamiento de la capacidad potencial de este sistema fijador.

2.-Proceso de nodulación.

Las leguminosas responden a la inoculación con su *Rhizobium* específico desarrollando unas estructuras únicas en las que tiene lugar la fijación simbiótica de nitrógeno: los nódulos. La morfogénesis de un nódulo parece ser inducida por al menos dos señales distintas (Hirsch, 1992): una procede de la bacteria y se trata del producto de los genes *nod* (factor Nod). Estos genes, en el género *Rhizobium*, se localizan en los plásmidos simbióticos o pSyms, plásmidos de elevado peso molecular donde residen una serie de genes esenciales para el establecimiento de una simbiosis efectiva (*nif*, *fix*, *nod*, *hsn*, *exo*). En *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, los genes *nod* son de localización cromosómica (Long, 1989). Se cree que una segunda señal se genera dentro de la planta tras la interacción con el factor Nod. Aunque se desconoce la identidad de esa segunda señal, parecen estar implicados cambios en el balance endógeno de hormonas vegetales así como la sensibilidad de los tejidos de la planta a esas hormonas.

La formación de un nódulo fijador es un proceso complejo que puede ser dividido en las siguientes etapas:

2.1.-Colonización y quimiotaxis de la raíz

El preludeo a la infección de las raíces de leguminosas por *Rhizobium* conlleva el crecimiento de la bacteria en la rizosfera (fenotipo **Roc**) (Hirsch, 1992). Las raíces de las plantas leguminosas exudan al suelo una serie de compuestos de bajo peso molecular, entre los que se encuentran los flavonoides que actúan como quimioatrayentes induciendo los genes de la nodulación (*nod*) de *Rhizobium*, genes que no se expresan o lo hacen a niveles muy bajos en vida libre en ausencia de la planta (Long, 1989).

2.2.-Adhesión a la raíz

Tras la quimiotaxis, las células de *Rhizobium* se adhieren a los pelos radicales de la planta (fenotipo Roa), fundamentalmente a aquellos recientemente aparecidos (Bhuvanewari *et al.*, 1980). Se sabe que tanto rizobios homólogos como heterólogos son capaces de unirse a los pelos radicales de una determinada planta y que en el caso de una unión no específica no se requiere la presencia del plásmido simbiótico (Smit *et al.*, 1992). La adhesión a los pelos radicales tiene lugar de manera polar, es decir, es el extremo de la célula bacteriana el que contacta con el pelo radical.

El proceso de unión ocurre en dos etapas. La primera está mediada por una proteína de unión a Ca^{2+} localizada en la superficie de la bacteria denominada ricadhesina, y cuya expresión es independiente de la presencia del plásmido simbiótico (Smit, 1989). Los iones de Ca^{2+} no parecen estar implicados en la unión de la ricadhesina a la superficie de la planta, sino en el anclaje de la proteína a la superficie de la bacteria (Smit *et al.*, 1992). No se conoce el supuesto receptor de la planta que interaccionaría con esta proteína. A continuación se producirá una unión más fuerte. Dependiendo de las condiciones de crecimiento de la bacteria, esta etapa estará mediada por lectinas de la planta y/o por apéndices bacterianos tales como fibras de celulosa o fimbrias (Smit, 1987; Vesper y Bauer, 1986; Smit *et al.*, 1992). Durante mucho tiempo se ha propuesto que la especificidad de la unión venía mediada a través de la interacción entre componentes superficiales de la bacteria (polisacáridos) y lectinas de la pared celular de la planta, siendo estas últimas, glicoproteínas que presentan una elevada especificidad y afinidad de unión por residuos azucarados (Bohlool y Schmidt, 1974). Hoy se sabe que las lectinas pueden estar implicadas en la adhesión, pero sólo cuando la bacteria ha estado sometida a determinadas condiciones de crecimiento (Dazzo y Brill, 1979; Mort y Bauer, 1980). Así p. e., en condiciones de limitación de C, se produce una unión inespecífica en la que no intervienen dichas glicoproteínas. Además, la edad del cultivo afecta a la expresión de receptores de lectinas en la superficie bacteriana. Actualmente, a las lectinas se les asigna un papel esencial en la nodulación, pero relacionándolas con un paso posterior al proceso de adhesión, que podría ser el inicio de la formación del canal de infección. En cuanto a los apéndices fibrilares, estos permitirían una agregación bacteriana y el anclaje de las bacterias a la superficie de la célula vegetal consiguiendo así una unión más firme. Si bien la primera etapa en el proceso de adhesión es absolutamente necesaria para que la infección conlleve a una nodulación efectiva, se sabe que el paso mediado por apéndices fibrilares no lo es, aunque quizá sea importante para la capacidad competitiva de los rizobios en condiciones de campo (Smit *et al.*, 1992).

2.3.-Curvatura del pelo radical.

Tras el contacto de *Rhizobium* con la leguminosa se produce la deformación y curvatura del pelo radical (fenotipo **Hac**). Dependiendo del hospedador, la deformación ocurrirá entre las 6-18 h tras la inoculación. Los rizobios interaccionan con casi todos los pelos radicales pero sólo el 25% de ellos sufren curvatura (Kijne, 1992). Esta curvatura parece ser el resultado de una estimulación local del crecimiento del extremo del pelo radical y no de una inhibición del crecimiento (Kijne, 1992). La presencia de genes *nod* y genes implicados en la síntesis de exopolisacáridos (*exo*) es necesaria para la producción de estos cambios en los pelos radicales.

2.4.-Formación del canal de infección e iniciación del nódulo.

Una vez que los rizobios han quedado atrapados tras la curvatura del pelo radical, se produce la entrada de las bacterias en la raíz (fenotipo **Inf**). La infección comienza con una hidrólisis muy localizada de la pared celular de la planta en la curvatura del pelo radical (Bakhuzien, 1988). El mecanismo de hidrólisis no es conocido; o bien la bacteria puede inducir enzimas hidrolíticas que son responsables de la disolución de la pared celular o alternativamente la bacteria puede activar genes de la planta implicados en este proceso, como ocurre cuando las células epidérmicas forman los pelos radicales (Kijne, 1992). En aquellos sitios donde la pared celular ha sido hidrolizada, los rizobios penetran en la raíz, por invaginación de la membrana plasmática. Alrededor de la membrana invaginada, la planta forma una estructura tubular llamada cordón de infección por deposición de material parecido al de la pared celular (Kijne, 1992). Dentro de este cordón la bacteria se multiplica. El núcleo de la célula hospedadora, unido por microtúbulos al extremo del canal de infección, precede a dicho canal a su paso a través de la célula del pelo radical.

Tras las etapas de preinfección, y concretamente como consecuencia de la actuación del factor Nod, determinadas células del córtex comienzan a dividirse para formar un primordio nodular (fenotipo **Noi**). Según dónde tengan lugar esas divisiones (parte interna o externa del córtex), se originará un nódulo de tipo indeterminado o determinado. Los nódulos indeterminados tienen un meristemo terminal persistente que se origina como consecuencia de la actividad mitótica de células localizadas en la parte interna del córtex, se forman en general en leguminosas de clima templado. En cambio, las leguminosas tropicales tales como soja y judía, forman nódulos determinados de estructura globulosa, en los que la actividad mitótica del córtex externo de la raíz cesa durante el desarrollo, siendo la expansión más que la división celular la responsable del incremento del tamaño del nódulo.

Ciertos genotipos de alfalfa son capaces de formar nódulos de forma espontánea (Truchet et al., 1989). Por otra parte, se sabe que el tratamiento de leguminosas con inhibidores del transporte de auxinas en el tallo, da lugar a la formación de

"pseudonódulos"(Hirsch et al., 1989). Estos hechos son los que sugieren la existencia de una segunda señal, independiente del factor Nod, y que puede estar relacionada con un desequilibrio en el balance endógeno de hormonas vegetales.

El cordón de infección transportará las bacterias desde el extremo del pelo radical hasta el primordio nodular. Entre los genes que se han relacionado con la formación y crecimiento del cordón de infección se encuentran genes *nod*, *exo*, *lps* (síntesis de lipopolisacáridos), *ndv* (síntesis y transporte de $\beta(1-2)$ glucanos), así como genes relacionados con resistencia a drogas, auxotrofia y metabolismo de carbohidratos (Djordjevic, 1987b).

El porcentaje de infecciones que finalmente dan lugar a la formación de nódulos fijadores es muy bajo, 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, 1992). Así, en las células donde se detiene el desarrollo del canal se ha detectado la presencia de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, enzimas de la ruta fenilpropanoide y de la producción de fitoalexinas, así como la acumulación de compuestos fenólicos.

2.5.-Liberación de la bacteria. Diferenciación en bacteroide. Fijación de N₂.

Los cordones ramificados penetran en las células de la región central del primordio. En estas células las bacterias salen desde el extremo del cordón de infección al citoplasma de la planta (fenotipo **Bar**), mediante un proceso endocitótico en el cual la bacteria queda rodeada por una membrana peribacteroidal que deriva del plasmalema de la célula vegetal (Roth, 1988). Finalmente, estas bacterias se diferenciarán en su forma pleiomórfica endosimbiótica de bacteroides (fenotipo **Bad**) que serán las encargadas de llevar a cabo la fijación de N₂ (fenotipo **Nif**).

3.-Genes bacterianos que controlan la nodulación.

Entre los genes esenciales para la infección y la formación de nódulos se encuentran los genes de nodulación (genes *nod* y *nol*), y otra serie de genes implicados en la estructura de la superficie bacteriana, tales como los genes que intervienen en la síntesis de exopolisacáridos (genes *exo*), lipopolisacáridos (genes *lps*) y β -glucanos (genes *ndv*).

3.1. Genes de la nodulación.

Los genes de la nodulación (genes *nod* y *nol*), presentan una organización en operones muy similar en las especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Fig. 1A). En el género *Rhizobium*, se localizan en los plásmidos simbióticos (plásmidos Sym) en la proximidad de los genes de la fijación de N₂, mientras que en *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, estos genes son de localización cromosómica (Long, 1989).

3.1.1.-Genes comunes de la nodulación.

Son aquellos genes que están estructural y funcionalmente conservados en la mayoría de los rizobios (Kondorosi, 1984). Se encuentran organizados en dos unidades transcripcionales: *nodD* y *nodABCIIJ*. Mutaciones en los genes *nodABC* impiden la curvatura del pelo radical (Hac⁻), la formación de cordones de infección y la división de las células del córtex (Long, 1989). Otro gen esencial es el gen *nodD* del que puede haber varias copias dependiendo de la especie de rizobio. Este gen se comporta como común en algunas plantas hospedadoras, mientras en otros casos determina especificidad de hospedador (Györgypal, 1991; Spaink, 1987). La región *nodIJ* no es absolutamente necesaria para la simbiosis y mutaciones en estos genes sólo causan un ligero retraso en la nodulación (Kondorosi, 1985).

3.1.2.-Genes que controlan la especificidad de hospedador.

Estos genes (antes denominados *hsn*) son aquéllos que determinan la especificidad de la bacteria por una planta determinada. Mutaciones en estos loci no pueden ser funcionalmente complementadas por regiones análogas de otras especies de rizobios. Dichas mutaciones, además de causar un retraso o una menor efectividad de nodulación, pueden alterar el rango de hospedador del rizobio mutado. Los que han sido mejor caracterizados son los genes *nodFEGH* en *R. meliloti* y *nodFE* en *R. leguminosarum* y *R. trifolii*. Algunos genes *hsn* se encuentran presentes en todas las especies de *Rhizobium*, por ejemplo *nodFE*, *nodL* y *nodM*. Otros en cambio, se encuentran sólo en determinadas especies o biovariedades; por ejemplo, *nodO* en *R. leguminosarum* *bv. viciae*, *nodH* y *nodPQ* en *R. meliloti*, *nodZ* en *B. japonicum* o los genes *nodSU* los cuales sólo han podido ser identificados en *B. japonicum* USDA 110, en *Rhizobium* sp NGR234, en *Azorhizobium caulinodans* y en *R. fredii* USDA 257.

3.1.3.-Determinantes de nodulación específicos de un genotipo o cultivar.

Estos genes (GSN o CSN si el genotipo es una variedad cultivada) son aquéllos que permiten la nodulación de genotipos específicos dentro de una especie dada de leguminosa.

Fueron identificados inicialmente en la cepa TOM de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Esta cepa asiática es capaz de nodular un cultivar asiático de guisantes, cv. Afghanistan, pero no lo pueden hacer las cepas europeas de *R. leguminosarum* (Brewin, 1980). Posteriormente, se comprobó que era un gen, *nodX*, localizado en el plásmido simbiótico y detrás de los genes *nodIJ*, el responsable de la capacidad de TOM de infectar la variedad Afghanistan de *Pisum sativum* (Davis, 1988), el cual es inducido por exudados de la raíz de guisante. Parece existir una interacción gen-a-gen en la cual un único gen dominante en la cepa TOM de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (*nodX*) está controlado por un único gen recesivo en la planta (*sym-2*). No se han encontrado homólogos a *nodX* en otras cepas de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Aunque se desconoce la función bioquímica de NodX, se sabe que la cepa TOM presenta un perfil distinto de lipooligosacáridos o factores Nod del que presentan las demás cepas de *R. leguminosarum* (López-Lara *et al.*, 1993). Por otra parte, se sabe que la cepa europea de *R. leguminosarum* PF₂, es capaz de bloquear la nodulación por la cepa TOM de la variedad Afghanistan (Winarno y Lie, 1979). A este fenotipo se le ha denominado Cnb (competitive nodulation blocking) y se sabe que está determinado por los genes *nodABC* y *nodFE* de PF₂ (Dowling *et al.*, 1989). El papel preciso de estos genes en el bloqueo aún se desconoce.

Otro gen específico de cultivar identificado es el gen cromosómico *nolC* de *R. fredii* USDA257 (Heron, 1989; Krishnan y Pueppke, 1991). Este gen determina el que la cepa sólo nodule variedades primitivas de soja (como la Peking), pero no nodula variedades comerciales más avanzadas (como la McCall). Mutantes obtenidos en *nolC* difieren de la cepa parental tanto en la interacción con el cultivar Peking (los nódulos formados presentan anomalías estructurales y una capacidad disminuída para fijar N₂), así como en la producción de exopolisacáridos (Krishnan y Pueppke, 1992). Este gen presenta una fuerte homología con el gen *dnaJ* de *E. coli* implicado en procesos de choque térmico. Se piensa que *nolC* debe ser un gen regulador ya que es capaz de modificar la cantidad de EPS producido, así como modular los niveles de nodulinas de la planta.

Entre otros genes determinantes de la especificidad de cultivar, se han identificado el gen *nodT* de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* que es necesario para la nodulación de *Trifolium subterraneum* cv. Woogenellup (Lewis-Henderson y Djordjevic, 1991), o el gen *nolA* de *B. japonicum* USDA 110 (Sadowsky *et al.*, 1991) que parece codificar para una proteína reguladora transcripcional de unión a ADN según se deduce de su homología con otra proteína reguladora transcripcional, MerR.

3.2.-Factores Nod.

El resultado de la activación de los genes *nod* es la aparición de proteínas que están implicadas en la síntesis de compuestos señales extracelulares, conocidos como factores Nod o lipooligosacáridos. Estos compuestos son capaces de producir una respuesta en la planta a concentraciones muy bajas ($10^{-11}M$). Se sabe que los lipooligosacáridos por sí solos, inducen la deformación y curvatura de los pelos radicales, el desarrollo del meristemo nodular, al mismo tiempo que llegan a inducir algunas de las nodulinas tempranas del proceso simbiótico (Denarié y Roche, 1992). Recientemente, van Brussel *et al.* (1992) han demostrado que el lipooligosacárido de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, es capaz de inducir la formación de la estructura que precede a la formación del canal de infección, denominada Pit (pre-infection thread), caracterizada por filas radiales de células que presentan puentes citoplasmáticos dispuestos también en forma radial, a través de los cuales posteriormente crecerá el canal de infección.

NodRm-1 producido por *R. meliloti* fue el primer Factor Nod del que se conoció su estructura, la cual se representa en la Fig. 1B-1 (Lerouge *et al.*, 1990). La estructura general de estos factores es la de un tetra- o pentámero de N-acetilglucosaminas con diferentes sustituciones. *R. meliloti* produce una familia de lipooligosacáridos sulfatados (6 compuestos) que exhiben diferentes grados de especificidad por el hospedador (Schultze *et al.*, 1992).

También se han identificado este tipo de moléculas en otras especies de *Rhizobium* (Spaink *et al.*, 1991a,b). En el caso de los factores Nod de *R. leguminosarum*, de los que hay al menos 5, la principal diferencia con los de *R. meliloti* radica en la ausencia del grupo sulfato (Fig. 1B-3). También existen diferencias entre NodRm1 y el factor Nod de *R. leguminosarum* bv. *viciae* en cuanto a la longitud de la cadena de ácido graso y su grado de insaturación, así como la existencia de un grupo O-acetilo en el extremo no reductor de la molécula. Las regiones supuestamente implicadas en determinar especificidad de hospedador son: (1) el grupo sulfato de los factores de *R. meliloti*, (2) el grupo acilo altamente insaturado de los factores de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y (3) el grupo O-acetilo de los factores de *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

El lipooligosacárido de *B. japonicum* USDA 110, llamado NodBj-V, es muy similar al de las especies de *Rhizobium* (Fig. 1B-2) La única diferencia es la presencia de un azúcar adicional, la 2-O metilfucosa, que se encuentra ligada al extremo reductor (Sanjuan *et al.*, 1992). El residuo fucosílico parece jugar un papel muy importante en la especificidad de la simbiosis *B. japonicum* /soja, ya que su eliminación produce un compuesto muy similar a uno de los metabolitos no específicos de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Spaink *et al.*, 1991b).

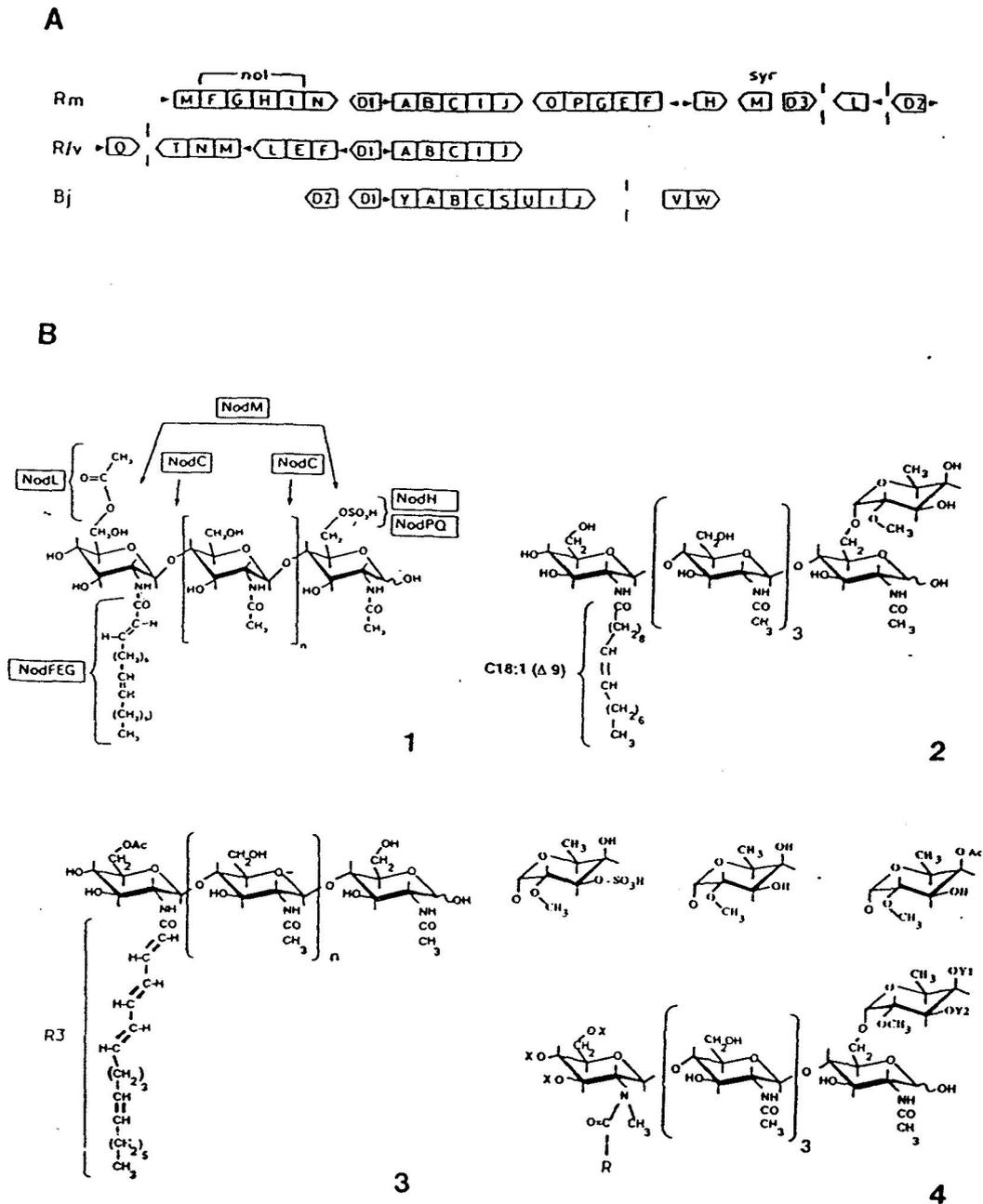


Figura 1.- (A) Organización de los genes de la nodulación en *R. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *B. japonicum*, tomada de Györgypal *et al.*, 1991. (B) Estructura de los factores Nod de (1) *R. meliloti* (Hirsch, 1992), donde se indica además con flechas las funciones propuestas para los productos de los genes *nod*, (2) *B. japonicum* (Sanjuan *et al.*, 1992), (3) *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Spaink *et al.*, 1991) y (4) *Rhizobium* sp. NGR234 (Price *et al.*, 1992). n=2 ó 3; x=carbamoil; R=ácido vaccénico o ácido palmítico.

Rhizobium NGR234, una cepa tropical de amplio rango de hospedador, produce una familia de factores Nod que son pentámeros de N-acetilglucosamina mono acilados con una gran variedad de sustituciones (Fig. 1B-4) (Price et al., 1992). La principal característica de NGR234 radica en secretar una mezcla de factores sulfatados y no sulfatados. Esta propiedad puede ser la base de su promiscuidad.

En cuanto al modelo propuesto de actuación de los factores Nod, los residuos de N-glucosamina de la molécula reaccionarían con sitios específicos de un receptor, probablemente una lectina (Lugtenberg et al., 1991). La intensidad de la interacción entre el factor Nod y su receptor regularía los primeros eventos de la nodulación. En este modelo, el factor funcionaría *in situ* como parte integrante de la membrana bacteriana en la cual estaría embebida la porción lipídica de la molécula (Hirsch, 1992).

3.3.-Funciones bioquímicas de los genes *nod*.

En cuanto a la función de los productos codificados por los genes *nod* en la síntesis de estas moléculas señales, se ha sugerido que los genes *nod* comunes estarían implicados en la síntesis y tal vez en la secreción de la estructura carbonada mientras los genes *hsn* intervendrían en la adición de sustituciones a la molécula fundamental (de Bruijn y Downie, 1991; Okker et al., 1992). En la Fig. 1B-1 se indican las funciones propuestas para los productos de los genes *nod*. Se sabe que los genes *nodABC* son suficientes para sintetizar la molécula señal. NodC parece estar implicada en la formación del esqueleto del lipooligosacárido, ya que muestra homología con quitina y celulosa sintetasas (Atkinson y Long, 1992; Debellé et al., 1992). NodB es la deacetilasa encargada de eliminar el grupo acetilo de la N-acetilglucosamina, a la cual posteriormente, habrá de unirse un grupo acilo (John et al., 1993). NodA parece funcionar como una acil transferasa. Los genes *nodIJ*, que tienen un papel menos importante en la simbiosis, parecen tener la misión de exportar los metabolitos Nod. De hecho, NodI muestra homología con proteínas de transporte dependientes de ATP, y además está localizada en la membrana citoplasmática (Downie, 1991). Los genes *nodHPQ* están implicados en la adición de un grupo sulfato a la molécula NodRm-1. De hecho, los productos de *nodPQ* son funcionalmente equivalentes a los productos de los genes *cysCD* de *E. coli*, implicados en la formación de adenosin 5'-fosfosulfato, que interviene en las reacciones de transferencia de grupos sulfato (Schwedock y Long, 1990). El producto NodH está implicado en la transferencia del grupo sulfato activado, al extremo reductor del oligosacárido (Roche et al., 1991). *nodFE*, son genes claves en la determinación de la especificidad de hospedador, al ser responsables de la naturaleza del grupo acilo que va a quedar ligado al polímero de glucosamina. *nodF* muestra homología con proteínas portadoras de grupos acilo, implicadas en la síntesis de ácidos grasos (Shearman et al., 1986), mientras que *nodE* se asemeja a las β -cetoacilsintetasas

(Downie, 1991). El producto de *nodL* es el encargado de unir un grupo acetilo al extremo reductor de una poliglucosamina acilada. La misión de NodM, que muestra homología con la glucosamina sintetasa de *E. coli*, parece ser que es proveer con suficiente cantidad de unidades de azúcar para la síntesis de la molécula señal (Baev *et al.*, 1991). No obstante, NodM parece tener funciones adicionales puesto que tiene distintos efectos en distintos hospedadores. Además, mutaciones en *nodM*, determinan que no haya un completo desarrollo de los bacteroides (Baev *et al.*, 1992). En el caso de *R. leguminosarum* bv *viciae* mutantes *nodM* presentan un fenotipo salvaje, lo cual es fácil de explicar puesto que existe un gen cromosómico *glmS*, que realiza la misma función (Marie *et al.*, 1992) La proteína NodO de *R. leguminosarum* bv *viciae*, que presenta homología con la hemolisina de *E. coli* y que es secretada al medio por un mecanismo que no implica a un péptido señal, se ha visto que es esencial para la nodulación de *Vicia sativa* (veza), cuando los genes *nodFE* se hallan ausentes (Scheu *et al.*, 1992). Aún no se conoce cuál es su papel durante la infección.

3.4.-Regulación de los genes *nod*.

La expresión de los genes *nod* requiere la presencia del gen regulador *nodD* y de moléculas señales procedentes de la planta, conocidas con el nombre de flavonoides (Fischer y Long, 1992; Györgypal *et al.*, 1991a; Schlaman *et al.*, 1992). En los rizobios de rápido crecimiento, estos inductores suelen ser flavonas y flavanonas, mientras que los inductores para las especies de *Bradyrhizobium* suelen ser isoflavonas (Fig.2). *nodD* se expresa de forma constitutiva y codifica una proteína (NodD) que es un activador transcripcional y que se une a una secuencia de ADN de 47 pares de bases conocida como *nod*-box localizada delante de todos los operones *nod* inducibles. Algunas especies de *Rhizobium* poseen un único gen *nodD*, aunque otras como *R. meliloti*, pueden poseer hasta tres copias del mismo. En aquellos casos en que existe un solo gen, mutantes *nodD* son defectivos para la nodulación de cualquier hospedador, mientras que la mutación de uno solo de los tres genes *nodD* de *R. meliloti* afecta la eficiencia de nodulación de forma diferente en distintos hospedadores (Schlaman *et al.*, 1992; Györgypal *et al.*, 1991b). En *R. meliloti* se ha encontrado una proteína represora (NolR) que actúa en *trans*. Esta proteína se une a los promotores de los genes *nodD1*, *nodD2* y *nodA*. Las cepas que poseen el gen represor presentan una mayor eficacia para la nodulación, lo que indica que un control fino de la expresión de los genes *nod* por factores tanto positivos como negativos, permite una óptima nodulación del macrosimbionte.

En el modelo propuesto por Kondorosi *et al.* (1991) de regulación de los genes *nod* en *R. meliloti* (Fig. 2C), en ausencia del inductor, el represor (NolR) se une a los promotores de *nodD* y *nodA* y compite con la ARN polimerasa, lo que da lugar a una baja producción de proteína NodD1. Las proteínas NodD disponibles (NodD1, NodD2 y

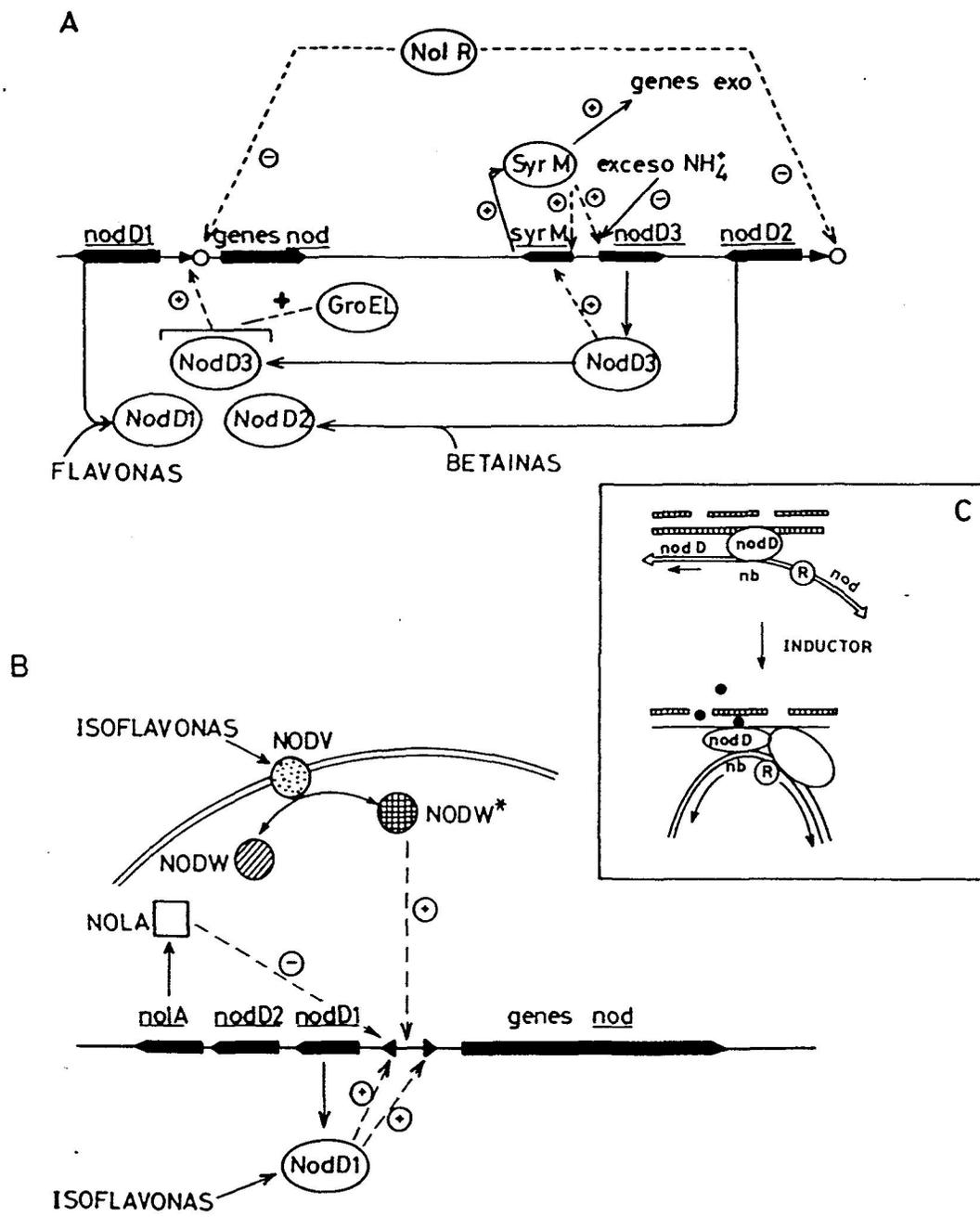


Figura 2.- Modelos de regulación de los genes de la nodulación de (A) *R. meliloti*, tomado de Denarié *et al.*, 1993 y (B) *B. japonicum*, cortesía de J. Sanjuan. (C) Modelo general para la regulación de los genes *nod* (Kondorosi *et al.*, 1991). nb=*nod*-box. R=represor.

NodD3) se unen a las cajas de nodulación, pero en su forma conformacionalmente inactiva, de tal modo que no puede promover a la ARN polimerasa para que transcriba *nodA*. La presencia de inductor hace que la proteína NodD pase a forma activa tras la interacción con el mismo. El complejo modificado de proteína NodD unida a las cajas de nodulación del ADN, se une a la ARN polimerasa que entonces compite con el represor y permite la transcripción del operón *nodABC*.

Existen otra serie de factores que influyen en la regulación de estos genes (Fig. 2A). Tal es el caso del locus *syrM* en *R. meliloti* que actúa como un regulador positivo. Además de estar implicada en la producción de polisacárido extracelular, en presencia de NodD3 permite la expresión de los genes *nod* de forma independiente al inductor y además extiende el rango de hospedador (Kondorosi, 1991). Por otro lado, la elevada concentración de amonio parece ser que regula negativamente la expresión de los genes *nod* en *R. meliloti*, en otras especies de amplio rango de hospedador y en *B. japonicum*. En *R. meliloti* y en NGR234 se ha encontrado que algunas mutaciones en el control global del nitrógeno (*ntrA* y *ntrC*) influyen de forma negativa en la expresión de los genes *nod* (Dusha *et al.*, 1989). En *R. meliloti* esta regulación depende de NodD3, y es controlado por un gen que todavía no se ha caracterizado. Las mutaciones en este gen eliminan el efecto inhibitor sobre la expresión de genes *nod*. Además, esta mutación hace a la cepa más competitiva que la silvestre. En el caso de *B. japonicum*, la represión de los genes *nod* por amonio es independiente de NtrC y NifA (Wang y Stacey, 1990).

Recientemente se ha puesto de manifiesto la necesidad de la presencia de proteínas homólogas a las chaperonas, que en *E. coli* se hallan codificadas por *groEL*, para que la proteína NodD3 sea activa (Fisher y Long, 1992). Su función aún es desconocida. Se cree que podrían estar implicadas en el ensamblaje de multímeros de NodD, en el ensamblaje del aparato de transcripción o bien en la translocación de NodD desde la membrana citoplasmática al citosol.

Aunque en principio se pensaba que la regulación de los genes de la nodulación en *B. japonicum* se ajustaba a los modelos establecidos para *Rhizobium*, resultados recientes demuestran que existen diferencias importantes. En *B. japonicum* la transcripción de los genes *nod* comunes es inducida por isoflavonas y requiere el gen *nodD1* (Fig. 2B). Dos genes *nodVW*, se han identificado como esenciales para la inducción de los genes *nod* en respuesta a las isoflavonas (Sanjuan *et al.*, en prensa). NodV y NodW muestran homología con las proteínas pertenecientes a la familia de sistemas reguladores de dos componentes (Göttfert *et al.*, 1990). En el modelo propuesto por Sanjuan *et al.*, 1993, NodV sería una proteína de membrana que actuaría como sensor de las moléculas inductoras. NodV activaría, quizás por fosforilación, a NodW, la cual en su forma activa sería entonces capaz de activar 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 (Sanjuan, comunicación personal).

En bacteroides de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y en *R. meliloti*, los genes *nod* inducibles no siguen expresándose (Schlaman *et al.*, 1991; Sharma y Signer, 1990), deteniéndose dicha expresión antes de que la bacteria sea liberada del canal de infección. Aunque los niveles de expresión de *nodD* se reducen en bacteroides hasta un 35% en *R. leguminosarum* y prácticamente a cero en *R. meliloti*, la ausencia de NodD no es la causa de que no se produzca expresión de estos genes. Se ha visto que NodD de bacteroides de *R. leguminosarum* bv. *viciae* no se une a los promotores de *nodF*, *nodM* y *nodO* y sólo lo hace muy débilmente al promotor de *nodA*. Se cree que esto es debido a que NodD se encuentra en los bacteroides en una forma alterada, probablemente, formando un complejo con una pequeña proteína específica del bacteroide, que no se sabe si está relacionada con NolR (Schlaman *et al.*, 1992). Este tipo de represión, indica que los metabolitos Nod son indeseables en el estado de bacteroide.

3.5.-Componentes de superficie que afectan al desarrollo del nódulo.

Numerosos estudios indican que la superficie de los rizobios juega un papel importante no sólo en el reconocimiento celular, sino también en momentos más avanzados de la interacción simbiótica. Entre los polisacáridos de superficie de *Rhizobium* se encuentran los exopolisacáridos (EPS), los lipopolisacáridos (LPS) y β -glucanos. Mutaciones en genes implicados en la síntesis de estos componentes superficiales, normalmente dan lugar a nódulos vacíos.

3.5.1.-Polisacárido extracelular (EPS)

El EPS I (succinoglucano) es un heteropolisacárido de gran tamaño constituido por una unidad octasacarídica de glucosa y galactosa con sustituciones de piruvato, acetato y succinato, que es producida bajo dos formas: una de alto y otra de bajo peso molecular. *R. meliloti* es capaz de producir un segundo exopolisacárido llamado EPS II, que difiere del EPS I en estructura y composición química.

En *R. meliloti* se han identificado trece loci localizados en el segundo megaplásmido y varios genes de localización cromosómica implicados en la síntesis del EPS I (Leigh *et al.*, 1985; Long *et al.* 1988). Las mutaciones en los genes plasmídicos *exoABFLMPQ* y en el gen cromosómico *exoC* bloquean totalmente la producción de EPS I (Long *et al.*, 1988; Zhan *et al.*, 1990). Estos mutantes forman nódulos vacíos en alfalfa, los cuales no presentan canales de infección ni bacterias intracelulares (Finan *et al.*, 1985, 1986; Leigh y Lee, 1988;

Hynes et al., 1986; Müller et al., 1988). Este fenotipo Ndv^- es completamente suprimido en alfalfa, pero no en otros hospedadores, por la producción de EPS II que normalmente es críptico (Glazebrook y Walker, 1989; Zhan et al., 1989). Las mutaciones en los genes plasmídicos *exoNKJG* y en el cromosómico *exoD* afectan a la cantidad o alguna cualidad del EPS. Mutantes en *exoG* o *exoJ* son capaces de formar nódulos fijadores aunque con una menor eficiencia (Long et al., 1988). Mutaciones en el gen *exoH* que afecta a la succinilación del EPS I, provocan la formación de nódulos aberrantes en raíces de alfalfa (Leigh et al., 1987). En *R. meliloti* se han descrito dos loci cromosómicos implicados en la regulación de la biosíntesis del EPS I, llamados *exoR* y *exoS* (Doherty et al., 1988). Mutaciones en estos genes causan superproducción de EPS I. Los mutantes en *exoS* son capaces de nodular normalmente pero los mutantes *exoR* presentan fenotipo Inf^- , lo que sugiere que una síntesis desregulada de EPS I es perjudicial para la nodulación y que una atenuación de la biosíntesis por *ExoR* es esencial en alguna etapa de la nodulación (Reed et al., 1991).

Como resultado de distintas observaciones se ha sugerido que el EPS es requerido para los nódulos indeterminados, pero no es necesario para los determinados (Gray y Rolfe, 1990; Gray et al., 1992; Noel, 1992).

Una dificultad para definir el papel de los EPS es que la gravedad del bloqueo de la infección depende de cada simbiosis particular: los mutantes Exo^- pueden ser Nod^- , no infectivos $Inf^- Ndv^-$, parcialmente infectivos Ndv^- , o $Nod^+ Fix^+$. Luego es posible que el EPS tenga diferentes funciones en diferentes combinaciones microsimbionte-hospedador, y más de una función en un hospedador dado (Noel, 1992).

Las posibles funciones de los exopolisacáridos en la simbiosis son: dar protección frente a las respuestas de defensa de la planta; actuar como una señal para la planta, bien sea como molécula de alto peso molecular o como oligosacárido; reconocimiento de los pelos radicales susceptibles de ser infectados; actuar como transportadores de enzimas extracelulares y formar parte de la matriz del cordón de infección.

La especificidad de acción de los EPS indica que deben tener un papel más allá del simple papel pasivo o estructural en la superficie de los rizobios. Por ejemplo, el EPS II de *R. meliloti* es suficiente para la simbiosis con alfalfa, pero no con otras cuatro plantas que normalmente son hospedadoras de esta especie. Un hecho que apoya que los EPS pueden actuar como moléculas señal son los resultados de adición de EPS. Así, Djordjevic et al., (1987a) demostraron que la adición de EPS o de fragmentos de él cuando se inoculan plantas con mutantes Exo^- de *Rhizobium* sp. NGR234 o de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* restauraba el fenotipo Fix^+ .

3.5.2.-Lipopolisacáridos (LPS)

El LPS es un componente importante de la membrana externa de la bacteria e interviene en la interacción entre ésta y su medio externo. En *Rhizobium* está formado por una porción polisacáridica y una porción lipídica (lípidos A). La fracción polisacáridica comprende un núcleo oligosacáridico y una molécula de gran peso molecular llamada antígeno O, muy variable, que confiere propiedades antigénicas específicas de la cepa. El lípidos A consiste en un oligosacárido (generalmente un disacárido) al que se unen ácidos grasos, y se encuentra situado en la bicapa de la membrana externa (Carlson, 1984).

Bhat et al. (1991), basándose en estudios de la composición y estructura de los núcleos oligosacáridicos y los lípidos A de los rizobios, han establecido tres grupos de LPSs: tipo I incluye todas las cepas de *R. leguminosarum* biovariedades *viciae*, *phaseoli* y *trifolii*; el tipo II incluye todas las cepas de *B. japonicum* y el tipo III las cepas de *R. meliloti* y *R. fredii*.

En la cepa CFN42 de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*, se han identificado cinco regiones genéticas que están implicadas en la síntesis del LPS; una de ellas está localizada en un plásmido nativo distinto del plásmido simbiótico, mientras que las demás se hallan en el cromosoma (Cava et al., 1989; Diebold y Noel, 1989). En *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39 se ha identificado una región cromosómica en la que hay cinco unidades transcripcionales, implicada en la síntesis del polisacárido O (Priefer, 1989). También en *R. meliloti* se han localizado en el cromosoma y en el segundo megaplásmido, genes que intervienen en la síntesis del LPS (Clover et al., 1989; Williams et al., 1990a, 1990b), aunque en ningún caso se han podido definir los efectos estructurales de las mutaciones en estos genes.

Los estudios genéticos han mostrado que mutantes en el LPS en las distintas biovariedades de *R. leguminosarum* y en *B. japonicum*, que carecen de antígeno O o que producen menor cantidad de lipopolisacárido, son defectivos en la simbiosis, siendo incapaces de inducir la formación del canal de infección, o bien si lo llegan a formar, finalmente aborta (Carlson et al., 1987; de Maagd et al., 1988). En cambio, Clover et al. (1989) han descrito que mutantes en los LPSs de *R. meliloti* no son defectivos en la simbiosis, pero en este caso no se conoce cómo están afectados los LPS.

Se han dado varias hipótesis a las posibles funciones del LPS en la simbiosis. Una posibilidad es que sirva como compuesto señal que dispare ciertos mecanismos importantes para la infección por *Rhizobium*, bien como receptores fijados a la membrana externa, bien como señal difusible. Otra posibilidad es que la capa de polisacáridos O que rodea a la bacteria actúe como un escudo hidrofílico que previene el acceso de moléculas tóxicas hidrofóbicas. Otro papel protector podría ser enmascarar a los precursores de las respuestas de defensa del hospedador (Djordjevic et al., 1987b). Un tipo de papel relacionado con los

dos anteriores es proveer una superficie bacteriana apropiada para la endocitosis y otras posibles interacciones entre superficies durante la infección (de Maagd et al., 1989).

3.5.3.-Beta Glucanos

Las cepas de *Rhizobium* y *Agrobacterium* producen β -1,2 glucanos (York et al., 1980; Zevenhuizen y Scholten-Koerselman, 1979), que se pueden aislar tanto del espacio periplásmico como del medio extracelular. Este polisacárido es un homopolímero formado por 17 a 24 restos de glucosa unidos mediante enlace β -1,2 y que generalmente no lleva sustituciones. *B. japonicum* no produce β -1,2 glucanos, pero en su lugar produce oligómeros más pequeños de residuos de glucosa con uniones β -1,3 y β -1,6, que pueden tener una función similar (Miller et al., 1990; Miller y Gore, 1992).

En *R. meliloti* se han identificado genes simbióticos esenciales que están relacionados estructural y funcionalmente con los genes de virulencia cromosómicos (*chv*) de *A. tumefaciens* y que se han denominado *ndvA* y *ndvB* (Dylan et al., 1986). Los loci *chvAB* y *ndvAB* están relacionados con la capacidad de las bacterias para sintetizar y exportar β -1,2 glucano cíclico. Las mutaciones en los genes cromosómicos *ndvA* y *ndvB* hacen que en *R. meliloti* esté afectada la síntesis de estos glucanos. Al igual que los mutantes *chv* de *A. tumefaciens* no se adhieren a las células vegetales (Douglas et al., 1982), Dylan et al., (1990b) han demostrado que los mutantes *ndv* de *R. meliloti* están seriamente afectados en su unión a raíces de alfalfa. Estos mutantes forman pseudonódulos que carecen de bacteroides, no tienen cordón de infección y no fijan nitrógeno (Geremia et al., 1987). *ndvA* codifica una proteína de 67,1 kDa que es homóloga a un gran número de proteínas transportadoras bacterianas dependientes de ATP. Esta proteína estaría implicada en la exportación de β -1,2 glucano desde la membrana interna donde es sintetizado al espacio periplásmico (Stanfield et al., 1988), similar a lo que ocurre con la proteína ChvA (Cangelosi et al., 1989). *ndvB* codifica una proteína de membrana interna de 319 kDa que no muestra homología con otras proteínas conocidas, y que estaría implicada en la síntesis del glucano (Ielpi et al., 1990).

Aunque está claro que mutaciones que suprimen la producción de β -1,2 glucanos afectan a la nodulación, no se puede asegurar que la pérdida de este polisacárido sea por sí misma la responsable de estos defectos. De hecho se han aislado pseudorrevertientes capaces de formar nódulos Fix^+ que no eran capaces de producir glucanos (Dylan et al., 1990b).

Se sabe que en *R. meliloti* el glucano es requerido para la adaptación a medios de baja osmolaridad (Dylan et al., 1990a; Soto et al., 1992). Mutaciones en los genes *ndvA* y *ndvB* dan lugar a la aparición de una serie de propiedades fenotípicas que sugieren alteraciones en la superficie de la bacteria resultantes del fallo en la osmoadaptación, tales como pérdida de la motilidad, resistencia a fagos, incremento en la resistencia a determinados antibióticos, o

alteración en los niveles de producción de exopolisacárido. Por otra parte, se sabe que medios hiperosmóticos inhiben la acumulación *in vivo* de glucano asociado a la célula en *A. tumefaciens*, *R. meliloti* y *B. japonicum* (Miller *et al.*, 1986; Dylan *et al.*, 1990a; Breedveld *et al.*, 1990; Tully *et al.*, 1990; Miller y Gore, 1992), al igual que ocurre con los oligosacáridos derivados de membrana (MDO) de *E. coli* durante el crecimiento en medios con altas concentraciones de sal o sacarosa (Bohin y Kennedy, 1984; Kennedy, 1982). No obstante, en la cepa de Rm GR4, no se detectan cambios en los niveles de glucano en respuesta a cambios en la osmolaridad del medio (Soto *et al.*, 1993), lo que puede significar un mecanismo diferente de osmoadaptación.

En cuanto a la posible función de los β -1,2 glucanos, el hecho de que este oligosacárido sea requerido para la adaptación a baja osmolaridad, significa que podría jugar un papel en la nodulación en el mantenimiento de la integridad celular de la bacteria. Otra posibilidad sugerida es que estas moléculas podrían actuar como protectoras frente a las reacciones de defensa de la planta (Gray *et al.*, 1992).

4.-Control de la nodulación llevado a cabo por la planta.

4.1.-Nodulinas.

En las leguminosas, son muy pocos los genes que controlan la nodulación que han podido ser estudiados (Nap y Bisseling, 1990; Caetano-Anollés y Gresshoff, 1991b). La expresión de la mayor parte de ellos ocurre en el nódulo y a las proteínas codificadas se les ha denominado NODULINAS (Delauney y Verma, 1988). Las nodulinas son, por definición, expresadas en el nódulo durante el desarrollo de la simbiosis, pero no en otras partes de la raíz o del resto de la planta. Un número pequeño de nodulinas han sido identificadas, fundamentalmente por comparación de los productos de la traducción *in vitro* de ARNs mensajeros de nódulo y raíz y la identificación de cDNAs por selección diferencial.

4.1.1.-Tipos de nodulinas.

Las nodulinas se expresan diferencialmente durante el desarrollo del nódulo, por lo que se dividen en dos grupos: A) nodulinas tempranas (ENOD), expresadas durante las primeras etapas de formación y desarrollo del nódulo, y B) nodulinas tardías (NOD), que se expresan en torno a la puesta en marcha del proceso de fijación de nitrógeno (Franssen *et al.*, 1992).

A) Nodulinas tempranas.

Dos nodulinas implicadas en el proceso de curvatura de los pelos radicales, RH-42 y RH-44, han sido identificadas en guisante (Gloude-mans *et al.*, 1989) y 3 proteínas en la promiscua leguminosa *Vigna unguiculata* (Krause y Broughton, 1992).

Entre las nodulinas tempranas con relación al proceso de infección y formación del nódulo, están las identificadas en guisante PsENOD2, PsENOD3, PsENOD5, PsENOD12 y PsENOD14 (Franssen *et al.*, 1992). Las proteínas PsENOD12 y PsENOD5 se han relacionado con el proceso de formación del canal de infección. Ambas son proteínas ricas en prolina, mientras que PsENOD12 parece formar parte del canal de infección y/o de la pared celular adicional de las células del córtex de la raíz, PsENOD5 se cree que es un componente de membrana. La glicoproteína PsENOD12 también ha sido relacionada con la formación del primordio nodular.

PsENOD3 y PsENOD14 son nodulinas que sólo se expresan en células del nódulo invadidas por bacterias y se cree que pueden ser proteínas de unión a metales, por ejemplo proteínas implicadas en el transporte de Fe o Mo hacia los bacteroides, los cuales requieren el aporte de estos metales para la síntesis de la nitrogenasa.

PsENOD2, también identificada en nódulos de soja, ha sido identificada como una (glico)proteína rica en (hidroxi)prolina de la pared celular del llamado parénquima nodular, un tejido específico del nódulo, compuesto de una o dos capas celulares con pequeños espacios intercelulares, y que contribuye a la formación de una barrera de difusión del oxígeno, protectora de los bacteroides.

B) Nodulinas tardías.

Entre las nodulinas tardías que se han identificado hasta el momento, las hay con una función metabólica y aquéllas con función estructural. Entre las nodulinas metabólicas, la más abundante es la leghemoglobina, que funciona como hemoproteína portadora de oxígeno, facilitando así la difusión controlada de oxígeno hacia los bacteroides. Existen varios tipos de leghemoglobinas, que se expresan diferencialmente durante el desarrollo de nódulos en soja y guisante. En nódulos de soja se ha identificado una uricasa (Ngm-35), una enzima clave en la ruta biosintética de ureidos en nódulos de tipo determinado, que se localiza preferentemente en peroxisomas de células no infectadas (Nguyen *et al.*, 1985). Glutamina sintetasa (GS), que cataliza el primer paso en la asimilación de amonio, ha sido identificada en alfalfa, soja y guisante. Enzimas del metabolismo del carbono (PEP carboxilasa, colina quinasa, xantina deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, etc) identificadas en nódulos, pueden representar formas enzimáticas distintas a las presentes en otros órganos y tejidos de la planta.

Algunas nodulinas tardías parecen tener una función estructural, como las identificadas en soja Ngm-23, Ngm-24 y Ngm-26 (Franssen *et al.*, 1992) que parecen formar parte de la membrana peribacteroidal. De ellas, Ngm-26 podría también tener un papel en el transporte de pequeñas moléculas a través de la membrana.

4.1.2.-Regulación de los genes de nodulinas.

Los genes de nodulinas están muy regulados tanto espacial como temporalmente durante el desarrollo del nódulo. Si bien hasta ahora no han podido ser identificados factores que actuando en *trans*, intervengan en la expresión de estos genes, sí que se han identificado secuencias reguladoras en *cis*. Así, se sabe que existen elementos esenciales para la expresión específica en el nódulo (OSE) y elementos que influyen en el nivel de expresión del gen: bien con un fuerte (SPE) o débil (WPE) efecto positivo, o bien con efecto negativo (NE). También se han identificado secuencias consenso en los promotores de estos genes, aunque no llegan a conservarse para todas las nodulinas.

Durante mucho tiempo se ha propuesto que diferentes condiciones fisiológicas en el nódulo, podrían jugar un papel en la regulación de los genes de nodulinas: concentración de O₂, niveles de amonio o incluso el grupo hemo. Sin embargo, los datos experimentales aún no son convincentes. Así, el papel de la baja concentración de O₂ en la activación de la expresión de algunos genes de nodulinas como el de la leghemoglobina o el de la n-uricasa aún permanece en duda. El grupo hemo de jugar algún papel sería el de una regulación a nivel post-transcripcional, mientras que ni el N₂ ni el amonio parecen ser esenciales para la expresión de estos genes.

Lo que sí parece cierto es que moléculas señales procedentes de *Rhizobium* son las que disparan la expresión de estos genes. Se sabe que los lipooligosacáridos causan la transcripción de los genes que codifican para las nodulinas PsENOD12, PsENOD5 y RH44. Por otra parte, en pseudonódulos inducidos en guisante y alfalfa por compuestos que inhiben el transporte de auxinas, se han detectado algunas nodulinas tempranas y sin embargo no se ha detectado ningún transcrito correspondiente a genes de nodulinas tardías (Hirsch *et al.*, 1989). Esto sugiere que la expresión de estos genes requiere necesariamente la existencia de compuestos señales procedentes de *Rhizobium*. Aún no se sabe cuáles son los genes rizobianos implicados en iniciar la expresión de genes de nodulinas tardías, aunque se proponen como buenos candidatos los genes implicados en la síntesis de polisacárido capsular (CPS) y del LPS, así como algunos genes *nod*.

4.2.-Genes de la planta que afectan la nodulación.

Diversos genes de la planta que afectan la formación del nódulo y su funcionamiento han sido descritos (Phillips y Teuber, 1992). Muchos de ellos seguramente corresponden a las ya mencionadas nodulinas. Uno de los primeros casos en los que se identificó un gen de la planta que controlaba la nodulación, fue en la simbiosis que se establece entre la cepa TOM de *R. leguminosarum* bv *viciae* y *Pisum sativum* cv Afghanistan. Como se comentó en el apartado 3.1.3, la variedad Afghanistan no puede ser nodulada por las cepas europeas de *R. leguminosarum* bv *viciae*. Este carácter está determinado por un único gen recesivo de la

planta: *sym-2* (Lie, 1984). Posteriormente, se identificaría el gen CSN *nodX* de la cepa TOM, que es el que interaccionando de forma gen a gen con el locus *sym-2*, permite la nodulación de la variedad Afghanistan. Otro ejemplo de restricción de la nodulación controlada por el hospedador, y que implica una interacción gen a gen similar a la anterior, es el que se ha encontrado en la simbiosis que se establece entre la cepa TA1 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* la cual presenta un fenotipo Nod⁻ con la variedad Woogenellup de *Trifolium subterraneum*. En este caso es el gen recesivo de la planta *rwt1* el que condiciona la restricción de la nodulación, mientras que en la cepa TA1 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* se han identificado dos genes *nodM* y *csn-1*, que son los que interaccionan de forma negativa con el gen de la variedad de trébol (Lewis-Henderson y Djordjevic, 1991). Recientemente, Caetano-Anollés y Greshoff (1992) han sugerido una posible interacción gen a gen en la simbiosis *Rhizobium*-alfalfa, entre los genes *nar* de la planta y *nodH* de la bacteria. Esta hipótesis procede de la observación de que la inoculación con mutantes *nodH* de plantas de alfalfa con fenotipo Nar (desarrollan nódulos en ausencia de rizobios), provoca un incremento de 4 a 5 veces el porcentaje de nódulos formados, llegando algunos de ellos a ser Fix⁺.

Se han identificado mutantes de diversas especies de leguminosas con alterada capacidad para la nodulación (Caetano-Anollés y Greshoff, 1991b; Chamber, 1991). Estos genotipos se han obtenido de mutantes espontáneos, o por mutagénesis bien química o radiactiva. Algunos, como *nod49* en soja, son mutantes que no permiten su nodulación por *B. japonicum*. Otros, como *nts382*, tienen la habilidad de formar un gran número de nódulos (3-40 veces más que la parental), incluso en la presencia de nitrato. Otros genes identificados, afectan la formación de nódulos por determinadas cepas pertenecientes a la misma especie bacteriana (*R_{j2}*, *R_{j4}* en soja; *sym-2* en guisante) (Phillips y Teuber, 1992). En estos casos, la planta sólo permite su nodulación por ciertas cepas o grupos de cepas (serogrupos) de una especie bacteriana. Otros genes parecen afectar no al proceso de nodulación en sí, sino al funcionamiento del nódulo (p. e., plantas de guisante que son Nod⁺Fix⁻), aunque no se dispone de modelos bioquímicos para explicar este tipo de fenotipos. (Phillips *et al.*, 1990).

Todos estos estudios han llevado a la conclusión de que 1) la planta posee todo el material genético necesario para la formación de nódulos radicales, siendo la función de la bacteria la de inducir su formación; y 2) la planta posee la capacidad de regular dónde y cuántos nódulos se formarán en la presencia de su (*Brady*)*Rhizobium* específico (Caetano-Anollés y Greshoff, 1991a).

4.3.-Autorregulación.

Existen numerosas evidencias que indican que en las leguminosas, la nodulación está controlada por un mecanismo que impide la formación de nuevos nódulos en la raíz, una vez formado un determinado número de ellos como consecuencia de las primeras infecciones. Así, Pierce y Bauer (1983) encontraron que una segunda inoculación, 15 h después de la primera, daba lugar a la aparición de muy pocos (o ninguno) nódulos adicionales en raíces de soja. La formación de nódulos es un proceso muy complejo y costoso para la planta, de ahí que el número de nódulos que es capaz de formar esté estrictamente regulado.

Se conoce muy poco acerca de los mecanismos por los cuales las leguminosas son capaces de captar la formación de los primeros nódulos, transmitir esa información en la planta y suprimir la formación de nuevos nódulos. Sí se sabe que se trata de una respuesta sistémica. Cuando las raíces de una planta se separaron en dos compartimentos distintos, se observó que la inoculación de las raíces de un compartimento, inhibía la formación de nódulos en el segundo compartimento, manteniéndose constante el número total de nódulos formados (Kosslak y Bohlool, 1984). Esta supresión de la nodulación incrementa a medida que aumenta el intervalo de tiempo entre las dos inoculaciones.

Además, distintos experimentos ponen de manifiesto que esta respuesta está controlada desde el tallo. Sin embargo, esta regulación es ejercida mediante diferentes mecanismos en las diferentes leguminosas. Así, mientras que en soja el bloqueo de la formación de nódulos ocurre durante el desarrollo de la infección (Calvert *et al.*, 1984), en alfalfa el bloqueo ocurre durante el inicio de la formación del nódulo (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1991a).

En cuanto a qué es lo que dispara esta respuesta sistémica, parece ser que varios genes bacterianos podrían tener un papel importante. De hecho, mutaciones en los genes *nodABC*, *nodE* y *nodH* impiden la respuesta de autorregulación en alfalfa, mientras que mutaciones en *nodIJ*, provocan sólo una débil respuesta. El desarrollo de la respuesta no parece requerir ni la presencia de canales de infección, ni la invasión de las células vegetales con rizobios, pero sí requiere la existencia de actividad mitótica en las células del córtex.

Basándose en las evidencias acumuladas, Caetano-Anollés y Gresshoff (1991) propusieron el siguiente modelo: Las divisiones de las células del córtex, resultado de un adecuado intercambio de señales entre el microsimbionte y la planta, dan lugar a la liberación de un inductor de respuestas en el tallo al que llamaron "inductor sintetizado en la raíz" o Q. Este mensajero, conllevaría toda una serie de sucesos que darían lugar a la aparición de un segundo mensajero sistémico, SDI, o inhibidor derivado del tallo que sería el que bloquearía la formación de nuevos nódulos.

5.-La competitividad por la formación de nódulos.

La competitividad de las estirpes rizobianas se puede definir como la capacidad para formar nódulos, con una determinada leguminosa, en presencia de otras estirpes de rizobios del mismo grupo de inoculación.

Para aumentar la cosecha de leguminosas en suelos con bajo contenido en N_2 y que carecen de poblaciones indígenas de *Rhizobium*, se dispone desde hace más de 80 años de inoculantes comerciales. Sin embargo, los inoculantes para leguminosas no se ha demostrado que sean efectivos en suelos con razas autóctonas. Esto se debe al problema de la competitividad. Inóculos preparados con razas muy efectivas en la fijación del N_2 se ha visto que son incapaces de formar una proporción significativa de nódulos en situación de campo por la competencia que se establece con las cepas autóctonas, muy bien adaptadas a su nicho ecológico (Temprano *et al.*, 1991; Triplett y Sadowsky, 1992). Esto ocurre incluso cuando los niveles de inóculo son muy superiores a los de rizobios indígenas existentes en el suelo. Así, Weaver y Frederick (1974) encontraron que la inoculación con una raza a un nivel 1000 veces superior al número de bradirizobios presentes en el suelo, daba lugar a que sólo la mitad de los nódulos estuviesen ocupados por la raza inoculante. Incluso, si el inóculo llega a nodular en la primera estación de crecimiento, puede no persistir para formar nódulos en la siguiente estación. La persistencia de *Rhizobium* en el suelo es la capacidad para multiplicarse y sobrevivir en ese medio a lo largo del tiempo. Competitividad y persistencia a menudo guardan una estrecha relación, y así, las estirpes más competitivas suelen tener más posibilidades de persistencia y viceversa.

La competencia por la nodulación se puede considerar en dos etapas. En la primera, las estirpes compiten para colonizar el suelo y la rizosfera, y en la segunda, las estirpes presentes en la rizosfera compiten por infectar la raíz y formar nódulos. En la primera etapa tienen una gran importancia los factores debidos al medio ambiente edáfico, mientras que en la segunda influyen más las características de las estirpes de *Rhizobium* y la leguminosa hospedadora.

Actualmente, se intenta abordar el problema de la competitividad de *Rhizobium* de varias formas:

1.-Alterando el rango de hospedador de las razas inoculantes de *Rhizobium* y/o usando genotipos de leguminosas con una infectividad restringida.

2.-Construcción de cepas de *Rhizobium* con una mayor capacidad para competir por la ocupancia de nódulos. En este sentido tienen importancia la identificación y el aislamiento de distintos determinantes genéticos que se piensa juegan un papel importante en el incremento de la competitividad de la cepa.

3.-Inoculación masiva. Consiste en aplicar a las leguminosas, inóculos elevados de cepas superiores, repetidas veces durante un período de varios años. De esta forma se

pretende que la cepa inoculante ocupe el suelo en un número suficiente como para limitar la ocupación de nódulos por las poblaciones indígenas.

4.-Control químico de la nodulación. Se han identificado muchos compuestos que inhiben la inducción por flavonoides de los genes *nod* en especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Kosslak *et al.*, 1990; Cunningham *et al.*, 1991). Por otra parte, Spaink *et al.* (1989) han conseguido construir un gen *nodD* capaz de activar la expresión de los genes *nod* en ausencia de flavonoides. Esta estrategia que consiste en inocular la leguminosa con una cepa que contenga un gen *nodD* flavonoide-independiente, junto con un inhibidor que impida la inducción del gen *nod* en las cepas indígenas, presenta dos importantes limitaciones prácticas: En primer lugar, los inhibidores de la inducción de los genes *nod* son inestables en suelo. En segundo lugar, no existe un único compuesto que inhiba la inducción de los genes *nod* en todas las cepas. Se requeriría la aplicación de varios inhibidores y esto hace encarecer el proceso.

6.-Factores ecológicos que afectan la competitividad.

Dentro de este apartado, se va a hacer referencia a aquellos factores que influyen sobre las poblaciones rizobianas (Dowling y Broughton, 1986; Hervás y Lluch, 1991; Temprano *et al.*, 1991), aunque por supuesto hay que tener en cuenta que cualquier factor que afecte de forma negativa al crecimiento de la planta, también afectará notablemente la competencia por la nodulación.

6.1.-Factores ambientales.

1.-Tipo de suelo.

El suelo es un reservorio de cepas de *Rhizobium* y las características intrínsecas de éste condicionarán las poblaciones nativas de rizobios presentes en él. La presencia de plantas en un suelo juega un papel muy importante en la supervivencia y desarrollo de las poblaciones rizobianas, ya que constituyen la mayor fuente de carbono para el mantenimiento de la comunidad bacteriana en las cercanías de la raíz (rizosfera). Los exudados radicales juegan un papel fundamental, no sólo porque proveen una fuente de carbono y energía, sino porque distintas sustancias exudadas tienen distinto poder quimioatractivo sobre diversas especies microbianas, con la consiguiente selección de microorganismos que colonizarán con mayor eficiencia la rizosfera e incluso la superficie de la raíz. Los rizobios indígenas suelen estar muy bien adaptados a vivir como saprofitos en suelos que no contienen plantas.

Existen una serie de factores físicos del suelo que afectan a la competitividad entre cepas rizobianas, entre los que hay que destacar los referentes a la textura y estructura. Se sabe, que suelos de textura fina y ácidos pueden ser problemáticos si contienen un exceso de

elementos tóxicos como el aluminio o el manganeso, si por su fracción mineralógica tienen una alta capacidad para adsorber fosfatos y si son propensos a cambios de estructura durante los ciclos de humedad/sequía (Bottomley, 1992). Por otra parte, la carga superficial de los minerales de arcilla también influye en el comportamiento de los rizobios en el suelo, ejerciendo una fuerza electrostática que variará dependiendo del tipo de rizobio. En cuanto a la estructura, el tamaño de las partículas y poros del suelo va a tener un papel importante, en relación con el tamaño celular. Así, aquellos rizobios de menor tamaño, pueden tener cierta ventaja ecológica al poder ocupar los poros más pequeños evitando de esta manera las fluctuaciones de potencial hídrico y la predación.

Una fuente combinada de N_2 y en particular el nitrato, se sabe que retrasa la formación de nódulos. Todas las etapas del desarrollo de la simbiosis pueden ser inhibidas por la presencia de nitrato (Carrol y Mathews, 1990). Sin embargo, no todas las cepas de *Rhizobium* responden de igual forma a la aplicación de la fuente nitrogenada. Por ej., se sabe que hay una cepa de *B. japonicum* (Mc Neil, 1982) que es más competitiva en suelos con altos niveles de nitrógeno.

Los niveles de fósforo en combinación con un determinado pH, pueden tener también una fuerte influencia en la competencia por nodulación.

2.-pH

La acidez del suelo, así como diversos factores asociados a la acidez, constituyen una importante limitación en muchos suelos agrícolas, afectando negativamente el crecimiento de la leguminosa huésped, la capacidad de nodulación de *Rhizobium* y la actividad nitrogenasa; sin embargo, ejerce poco efecto sobre la supervivencia de los rizobios en el suelo. La elevada concentración de iones H^+ presente en suelos ácidos, incrementa la solubilidad del Al, Mn y Fe induciendo su toxicidad. Los efectos negativos de las condiciones ácidas del suelo pueden ser debidas: al pH bajo "per se"; a la toxicidad del aluminio o manganeso; a la deficiencia o no disponibilidad de calcio, magnesio, fósforo y molibdeno, o a la combinación de estos factores.

Se sabe que pHs bajos inhiben la nodulación por *R. leguminosarum* bvs *viciae* y *phaseoli* y *Bradyrhizobium* spp. Las cepas de *Rhizobium* varían en su tolerancia a pHs ácidos. En general, los rizobios que son más sensibles al pH nodulan más lentamente que aquéllos que toleran mayor acidez.

3.-Niveles de Ca^{2+} .

El Ca^{2+} juega un papel indiscutible en la ecología de los rizobios. Las cepas de *R. meliloti* que son ácido-tolerantes requieren mayores niveles de este catión para su crecimiento que aquéllas que no lo son. En *R. leguminosarum* bv. *viciae* el Ca^{2+} juega un papel importante en la síntesis de la ricadhesina, así como en el mantenimiento de la estabilidad de ciertas proteínas de la membrana externa que se hallan ligadas al peptidoglicano. En

condiciones de pH bajo, para el proceso de infección de los pelos radicales se requieren mayores niveles de Ca^{2+} que los requeridos para el crecimiento de la leguminosa. Por otra parte, en estas mismas condiciones, se ha visto que un suplemento de Ca^{2+} incrementa la inducción de los genes *nod* de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.

4.-Temperatura.

La temperatura es el factor que más influye en la persistencia de *Rhizobium* en el suelo y en su capacidad para competir, además de influir en la tasa óptima de fijación de nitrógeno dentro del nódulo. Aunque este factor no puede ser controlado en condiciones de campo, sí se pueden seleccionar rizobios con una capacidad óptima para competir y fijar N_2 , en las condiciones reinantes. En general, se puede decir, que los rizobios compiten mejor a aquélla temperatura en torno a la cual gira todo su metabolismo.

5.-Humedad del suelo y salinidad.

Las condiciones de sequía, que a menudo van acompañadas de un estrés salino, afectan a la supervivencia y competitividad de los rizobios, existiendo además una gran relación con el pH y contenido de materia orgánica del suelo. Se ha visto, que poblaciones de *Bradyrhizobium* spp. son más persistentes que las de *Rhizobium*, en suelos que soportan déficits hídricos estacionales. Se cree que eso es debido a que las primeras, mantienen un contenido hídrico interno más bajo que las últimas.

La salinidad incide en el proceso de infección de las leguminosas por *Rhizobium* y en su persistencia en el suelo. Elevados niveles de cloruro sódico alteran el metabolismo celular bacteriano, contribuyendo a incrementar los niveles intracelulares de glutamato, posiblemente para mantener el balance iónico entre la célula y el medio. En consecuencia, el "stress" de salinidad altera la fijación de nitrógeno y síntesis de glutamina. Existen considerables diferencias entre las distintas cepas en la tolerancia a la salinidad aunque en general, las leguminosas son más sensibles que los rizobios a las condiciones salinas.

6.2.-Factores biológicos.

La microflora del suelo, aparte de las poblaciones autóctonas de rizobios, ejerce una gran influencia sobre la colonización de la rizosfera y la nodulación de las estirpes inoculadas. Algunos de estos factores afectan la competitividad de los rizobios, alterando el tamaño de la población en la rizosfera, como es el caso de los bacteriófagos o bacteriocinas.

En otros casos, como son la presencia del parásito intracelular *Bdellovibrio*, la presencia de protozoos o asociaciones con micorrizas, no se puede asegurar con certeza que tengan algún papel en la competitividad. Sí parece influir la existencia en el suelo de bacterias epifíticas como es el caso de *Erwinia herbícola*, que pueden suprimir la nodulación de los rizobios mediante la producción de una toxina, o bloqueando los sitios de unión a los pelos radicales (Handelsman y Brill, 1985).

6.3.-Otros factores: herbicidas y pesticidas.

Los herbicidas pueden influir en la competitividad de los rizobios, afectando al crecimiento de la planta. Por otra parte, se ha visto que *Rhizobium* es sensible a bajas concentraciones de fungicidas y que el tratamiento de las semillas con estos compuestos, a menudo conduce a una pobre nodulación. Por ello, sería bueno usar como inoculantes, aislados resistentes a este tipo de sustancias.

7.-Fenotipos y genes rizobianos implicados en la competitividad por la nodulación.

Dentro de los genes rizobianos que afectan a la competitividad por la nodulación, hay que incluir los genes *nod* comunes, los determinantes de la especificidad de hospedador (*hsn*), los determinantes de nodulación específicos de genotipo o cultivar (GSN o CSN), los genes *exo*, *lps* y *ndv*, de los cuales se ha hecho una revisión en el apartado 3. Mutaciones en estos loci pueden alterar la competitividad de la cepa al bloquear o retrasar la nodulación de su leguminosa hospedadora; o bien, como ocurre en el caso de algunos genes GSN, éstos alteran la competitividad al bloquear la nodulación de otras cepas competentes. Además de estos genes, se han identificado otra serie de loci y fenotipos que también se hallan relacionados con la capacidad competitiva de los rizobios.

7.1.-Antibiosis o Producción de bacteriocinas.

Determinadas cepas de *Rhizobium* producen antibióticos, algunos de los cuales inhiben específicamente a otras cepas de *Rhizobium*. De éstos, el mejor caracterizado ha sido la trifolitoxina (TFX), un pequeño péptido producido por la cepa T24 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Schwinghamer y Belkengren, 1968; Triplett y Barta, 1987; Triplett *et al.*, 1988). Este péptido es bacteriostático a bajas concentraciones para la mayoría de las cepas de *S. fredii* y *R. leguminosarum* bvs *trifolii*, *phaseoli* y *viciae*. Schwinghamer y Belkengren (1968) encontraron que esta cepa era altamente competitiva en la nodulación cuando se coinoculaba con una cepa sensible a la bacteriocina. Además, Triplett y Barta (1987) demostraron que mutantes Tn5 de T24 incapaces de producir trifolitoxina perdían su ventaja en la competitividad de nodulación cuando se coinoculaba con una cepa sensible. Desgraciadamente, la cepa T24 es *Fix*⁻, por lo que no puede ser usada como inoculante para resolver el problema de la competitividad en la inoculación de trébol.

Para intentar resolver este problema, los genes que codifican para la producción y resistencia a la trifolitoxina (*tfx*) se aislaron y se integraron de forma estable en el genoma de una cepa efectiva y sensible a la trifolitoxina, la cepa TA1 de *R. leguminosarum* bv *trifolii* (Triplett, 1990). La cepa resultante que producía trifolitoxina de forma estable en ausencia de presión selectiva, y que no presentaba ningún deterioro en sus propiedades simbióticas,

también era más competitiva que la cepa sensible a la bacteriocina. Recientemente, los genes *tfx* han sido secuenciados, revelando la presencia de siete fases de lectura abierta (Breil *et al.*, 1993). No obstante, a pesar de los avances realizados, aún no se sabe si los genes *tfx* pueden ser de utilidad en condiciones de campo.

7.2.-Características de la superficie celular.

Handelsman *et al.*, (1984) encontraron que cepas de *R. meliloti* con menor capacidad para ser aglutinadas por la aglutinina de alfalfa (LA), inducían antes la formación de nódulos y eran más competitivas que aquéllas que eran aglutinadas en mayor cantidad. Este hecho junto con la resistencia a determinados fagos, se asoció con un cambio en la superficie celular. Posteriormente se comprobó que la baja aglutinabilidad de las cepas LA se debía a la existencia en la superficie de la pared celular de un polisacárido de tipo antigénico, un ácido teicurónico formado por 10-15 repeticiones de un disacárido formado por galactosa y ácido galacturónico, unidos por un enlace glicosídico (Ugalde *et al.*, 1986a, 1986b). Se determinó además que el enzima responsable de la síntesis de este ácido teicurónico era una galactosil transferasa asociada a la membrana interna celular, que incorpora galactosa a un polímero aniónico insoluble en agua y precipitable con ácido tricloroacético (TCA).

En cuanto al papel que pueda tener el EPS en competitividad existen distintos resultados dependiendo de las especies de *Rhizobium*. Así, Araujo y Handelsman (1989) aislaron mutantes de *R. leguminosarum* bv *phaseoli* obtenidos con Tn5, no mucoides, que eran menos competitivos que la cepa silvestre. Igualmente ocurre para mutantes deficientes en EPS de *R. tropici* y *B. japonicum* (Bhagwat *et al.*, 1991). En el caso de *B. japonicum*, mutantes *exoB* que presentan un EPS alterado que carece de galactosa, presentan un retraso en la nodulación de aproximadamente 5 días y exhiben una competitividad muy reducida (Parniske *et al.*, 1993), lo que indica que un EPS con la estructura normal de la cepa silvestre contribuye en la competitividad por la nodulación de soja, afectando al desarrollo de la simbiosis durante los primeros estadios. En cambio, Zdor y Pueppke (1989) seleccionaron un mutante de *R. fredii* que producía menor cantidad de EPS que resultó ser más competitivo para la nodulación del cultivar Peking, cuando se comparaba con la cepa silvestre. No se conoce el efecto del EPS en la competitividad de *R. meliloti*, ya que mutantes EPS⁻ son Inf⁻.

Por último, se han descubierto algunas cepas de *B. japonicum* que producen grandes cantidades de un polisacárido (NPS) durante el estadio de bacteroide, dando lugar a grandes simbiosomas (Streeter *et al.*, 1992). Esta característica, aparentemente se correlaciona con una alta competitividad, ya que son precisamente los serotipos productores de NPS, los dominantes en la formación de nódulos en condiciones de campo.

7.3.-Motilidad.

Existen diversas evidencias que indican que la motilidad está implicada en la competitividad por nodulación, al permitir a los rizobios moverse hacia sustancias atrayentes (azúcares) o alejarse de irritantes (antibióticos, bacteriocinas). La primera prueba fue aportada por Ames y Bergman (1981) quienes encontraron que mutantes de *R. meliloti* no mótils (flagelados o no), eran menos competitivos que la cepa silvestre, aunque presentaban la misma tasa de crecimiento. Resultados similares obtuvieron Mellor *et al.* (1987) con mutantes obtenidos con Tn5 de *R. leguminosarum* bv *trifolii*.

7.4.-Velocidad de nodulación.

En *R. meliloti*, *R. leguminosarum* bvs *trifolii* y *phaseoli* se ha observado una correlación entre velocidad de nodulación y competitividad (Handelsman *et al.*, 1984; Stephens y Cooper, 1988; Graham y McDermott, 1989). Según la explicación dada por Dowling y Broughton (1986), las cepas de *Rhizobium* que consiguiesen nodular más rápidamente, serían más competitivas ya que son capaces de nodular antes de que se dispare el mecanismo de autorregulación de la planta (apartado 4.2).

Sargent *et al.* en 1987 obtuvieron una evidencia directa del papel de la autorregulación en la competitividad. Un mutante *nodFE*⁻ de *R. l. bv trifolii* que era incapaz de inducir la respuesta de autorregulación, resultó ser menos competitivo cuando se coinoculaba con la cepa silvestre. También se han obtenido evidencias de esta correlación en *B. japonicum* (Hahn y Hennecke, 1988).

7.5.-Efectividad simbiótica.

Existe una gran controversia en la literatura sobre si la capacidad para fijar N₂ juega algún papel en la competitividad de una cepa. Algunos datos sugieren que la planta hospedadora selecciona cepas efectivas, mientras que otros describen cepas inefectivas que son más competitivas. Sin embargo, el hecho de que mutantes *Nif*⁻ espontáneos u obtenidos con Tn5 de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* no tengan alterada su competitividad en relación con la cepa silvestre (Amarger, 1981; Hahn y Studer, 1986), parece indicar que la efectividad por sí misma no juega ningún papel en la competitividad.

7.6.-Genes que confieren una ventaja metabólica.

Las rizopinas son compuestos sintetizados dentro del nódulo por los bacteroides de determinadas cepas de *Rhizobium*. Constituyen un sustrato selectivo de crecimiento en la rizosfera para los rizobios inductores de esos nódulos, ya que no pueden ser catabolizadas por otras cepas. Al proporcionar una ventaja metabólica en la rizosfera, estos compuestos podrían contribuir a un incremento en la competitividad por la nodulación.

La L-3-O-metil-scylo-inosamina (3-O-MSI) (Tempé y Petit, 1983; Murphy *et al.*, 1987; 1988), fue el primer compuesto de este tipo identificado en nódulos de alfalfa inducidos por la cepa L5.30 de *R. meliloti*. Este compuesto se describió como una sustancia similar a las opinas, ya que sólo la cepa que induce su síntesis es capaz de catabolizarla y utilizarla como sustrato de crecimiento. Hoy se sabe que la 3-O-MSI puede ser también catabolizada por la cepa Rm 220-3 y una cepa de *R. l. bv viciae* (Murphy y Saint, 1992).

L5.30 contiene los genes necesarios para la síntesis y el catabolismo de esta rizopina: genes *mos* y *moc* respectivamente que se hallan localizados en el plásmido simbiótico (pSym) (Murphy *et al.*, 1987). Los genes *moc* se expresan en vida libre, y no se hallan regulados ni por *ntrC* ni por *nifA*, ya que mutantes en estos genes pueden catabolizar la rizopina. El locus *mos* se halla regulado por el gen *nifA* y solamente se expresa en el bacteroide. Esta regulación ocurre directamente a través de un promotor tipo *nif* (identificado mediante secuenciación) y no es un efecto secundario de otros genes regulados por *nifA*. Este tipo de regulación sugiere que estos genes deben tener un papel en la simbiosis.

Recientemente, ha sido publicada la secuencia del locus *mos* de Rm L5.30 (Murphy *et al.*, 1993), el cual se halla constituido por 4 genes. Tres de las proteínas codificadas por este locus, MosA, MosB y MosC son necesarias para la biosíntesis de la rizopina, habiéndose detectado su presencia en el nódulo. En cambio, ORF1, el cual muestra una gran homología con la región 5' del gen *nifH* de *R. meliloti*, no es necesario para la síntesis de la 3-O-MSI. Además la teórica proteína codificada por este ORF no ha podido ser detectada en el nódulo mediante el uso de anticuerpos. Esto ha llevado a los autores a sugerir que la finalidad de la presencia de esta secuencia en el locus *mos* es la de asegurar su regulación simbiótica.

Experimentos de coinoculación de una cepa L5.30::Moc⁻ con la cepa silvestre, ponen de manifiesto que la cepa que ocupa mayoritariamente los nódulos, es la silvestre, es decir, la que es capaz de utilizar la rizopina como sustrato de crecimiento. Esto podría ser explicado por una de estas dos hipótesis: O bien la cepa silvestre tiene una ventaja en la infección, o bien la tiene durante el crecimiento en un nódulo de doble ocupancia. El apoyo para la segunda hipótesis viene dado por el hecho de que los nódulos analizados después de mucho tiempo tras la inoculación, presentaban con mayor frecuencia la cepa capaz de catabolizar la rizopina que aquéllos nódulos analizados poco tiempo después de la inoculación.

Genes similares a los *moc* y *mos* de L5.30 han sido detectados en la cepa Rm 220-3 (Saint *et al.*, 1993), la cual es capaz de dirigir la síntesis y catabolizar la rizopina *scyllo-inosamina*. La regulación de estos genes es idéntica a la mostrada por L5.30.

Se han descrito otra serie de relaciones nutricionales entre la planta y la bacteria que pueden conferir una ventaja metabólica al microsimbionte, como es el caso de la calistegina, compuesto producido por la planta *Calystegia sepium*, y que Rm 41 puede utilizar como

fuerza de carbono y nitrógeno (Tepfer *et al.*, 1988), gracias a la presencia de los genes *cac* localizados en el plásmido críptico pRme41a. Las calisteginas parecen estar implicadas en la supervivencia de la bacteria, durante su crecimiento saprofítico en la rizosfera de una planta no hospedadora (Boivin *et al.*, 1990). Sin embargo, es necesario hacer experimentos de competitividad entre cepas isogénicas *Cac*⁺ y *Cac*⁻, para decir si estos genes pueden realmente determinar una ventaja selectiva. Un compuesto más específico es la L-homoserina, aminoácido detectado en exudados de raíces de guisante, que puede ser catabolizado por cepas de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Van Egeraat, 1975). La trigonelina, un metabolito secundario abundante en las leguminosas también puede ser utilizada como fuente específica de energía por la cepa Rm RCR 2011, donde los genes implicados en el catabolismo de este compuesto se hallan localizados en el pSym (Boivin *et al.*, 1989). La implicación de los genes responsables del catabolismo de estos compuestos en la competitividad por nodulación aún se desconoce.

7.7.-Genes que intervienen en la eficiencia de nodulación dependientes de *nifA*.

Toro y Olivares (1986) identificaron en el plásmido no simbiótico pRmeGR4b de *R. meliloti* GR4 una región que estaba implicada en la eficiencia de nodulación. Posteriormente Sanjuan y Olivares (1989) relacionaron esta región a la que se llamó *nfe* (nodule formation efficiency) con la alta competitividad mostrada por esta cepa. Además la expresión de esta región se vio que era dependiente de la presencia de un gen *nifA* funcional (Sanjuan y Olivares, 1991b). Por tratarse del tema base de esta Tesis, la identificación de esta región será explicada en detalle en un posterior apartado.

7.8.-Genes dependientes de *nifA* de función desconocida.

Sanjuan y Olivares (1991a) encontraron que un mutante *NifA*⁻ de *R. meliloti* presentaba una menor competitividad por la nodulación, comparada con la cepa silvestre. Esta pérdida de competitividad no era debida a la pérdida de efectividad simbiótica. Por otra parte, la adición de múltiples copias de *nifA* de *Klebsiella pneumoniae* en distintas cepas de *R. meliloti* que carecían de los genes *nfe*, resultó en un incremento de la competitividad, lo que significa que el gen *nifA* probablemente está regulando otros genes que se hallan implicados en este carácter fenotípico.

8.-El gen *nifA* como regulador de otros genes.

En los fijadores simbióticos *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, *nifA* parece tener una función que va más allá de la activación de los genes *nif* y *fix*. Entre los genes, no relacionados con fijación de nitrógeno, cuyos promotores son dependientes de *nifA* (*ndp*)(*nifA*-dependent promoter), se encuentran los genes *mos* de *R. meliloti* (Murphy *et al.*, 1988; Murphy *et al.*, 1993), de los que se habló en el apartado 7.6. Otro ejemplo lo constituyen una serie de genes implicados en la maduración y persistencia del nódulo. Así, el análisis estructural de nódulos formados por mutantes *nifA* de *R. meliloti* y *B. japonicum* ha mostrado que en ellos no se sintetizan una serie de nodulinas, entre ellas la leghemoglobina. En dichos nódulos, los bacteroides no llegan a alcanzar el estado maduro, tomando la zona infectada una apariencia necrótica que recuerda a las reacciones de las plantas cuando son infectadas por patógenos (Hirsch y Smith, 1987; Fischer *et al.*, 1986). Estos efectos no se observan en otros mutantes *nif* o *fix*. Tal vez *nifA* esté implicado en la creación de determinadas señales bacterianas hacia la planta que faciliten la maduración y desarrollo del nódulo.

En *R. leguminosarum* bv *phaseoli* la transcripción del gen *mela*, que codifica para una tirosinasa implicada en la síntesis de melanina, es activada por *nifA* de *K. pneumoniae* y *Rhizobium* (Hawkins y Johnston, 1988), aunque no se ha demostrado ninguna relación entre la producción de melanina y la nodulación o la fijación simbiótica de nitrógeno. Este tipo de regulación, en cambio, no se encuentra para el gen *mela* de *R. meliloti* GR4 recientemente clonado y secuenciado (Mercado-Blanco *et al.*, 1993).

En *B. japonicum*, mediante el uso combinado de un vector que permite clonar fragmentos de ADN genómico delante de un gen chivato sin promotor, y un procedimiento de selección que permite detectar promotores activados por NifA en condiciones anaeróbicas, se ha conseguido identificar una nueva región *ndp* (Weidenhaupt *et al.*, 1993). Esta región de ADN que presenta la secuencia consenso -24/-12, así como los potenciales sitios de unión de NifA e IHF (integration host factor), no es esencial para la simbiosis, lo cual se demuestra por el hecho de que mutantes en esta región obtenidos por delección presenten un fenotipo Nod⁺ Fix⁺. No se ha detectado homología con otras secuencias en el banco de datos, y su función aún se desconoce. El hecho de que no se haya identificado ningún ORF significativo en la región secuenciada hace sospechar que se trate de un pseudogen, similar a un gen *nifH* truncado encontrado en *R. meliloti* (Better *et al.*, 1983). Otro de los genes de *B. japonicum* clonados según este procedimiento ha sido el *glnII* que codifica para una de las glutamina sintetasas presentes en esta bacteria y que ya anteriormente había sido identificado (Carlson *et al.*, 1987).

Finalmente, entre los genes dependientes de *nifA*, que no son ni *fix* ni *nif*, se encuentran los implicados en eficiencia de la nodulación o genes *nfe*. (Sanjuan y Olivares, 1989).

9.-Región *nfe* de *R. meliloti* GR4.

9.1.-Identificación de la región *nfe*.

La cepa GR4 de *R. meliloti* se caracteriza por poseer, además de dos megaplásmidos o plásmidos simbióticos (pSym) donde se localizan genes esenciales para el desarrollo de la simbiosis, otros dos plásmidos de menor tamaño: pRmeGR4a de 114-megadaltons autotransmisible y al que aún no ha podido serle asociada ninguna característica fenotípica, y pRmeGR4b de 140-megadaltons (Toro y Olivares, 1986). Los plásmidos de RmGR4 se han venido relacionando con el mayor grado de infectividad mostrado por esta cepa (Olivares *et al.*, 1980), y con la capacidad para producir polisacárido ácido extracelular (Palomares *et al.*, 1979).

GRO13, una derivada de GR4 que ha perdido el pRmeGR4a, pero que todavía conserva el plásmido pRmeGR4b, resulta ser más infectiva y competitiva con respecto a otras cepas de *R. meliloti* ampliamente conocidas como son: 2011, AK631, L5.30 y 104A14 (Sanjuan, 1989). GRP4, una derivada de GR4 que ha perdido los dos plásmidos no simbióticos, presenta un nivel de infectividad y competitividad menor que el presentado por la cepa GRO13. Esto sugería que el plásmido pRmeGR4b era el responsable de la mayor infectividad y competitividad mostradas por GRO13, no sólo respecto a las derivadas curadas de este plásmido, sino también respecto a otras cepas de *R. meliloti*.

Gracias a la construcción de un banco de genes de pRmeGR4b, se pudieron identificar dos regiones que estaban relacionadas con el mayor grado de infectividad mostrado por la cepa GR4 (Toro y Olivares, 1986). Una de ellas (Inf1)(Fig. 3), localizada en el plásmido pRmNT40 (plásmido recombinante procedente del banco de genes), se encontró que hibridaba con sondas que contenían promotores tipo *nif* (P1, promotor del gen *nifH*, o P2, promotor del gen *fixA*) (Toro y Olivares, 1986; Sanjuan y Olivares, 1989), indicando la presencia de un promotor de este tipo en dicha región, y concretamente en un fragmento *Pst*I de 0,9 kb (*Pst*I 33a). La secuenciación de este fragmento, permitió a Sanjuan y Olivares (1989), detectar una región de 206 pares de bases que mostraba un 60% de homología con P1 y un 50% de homología con P2, y en la que se pudo identificar la secuencia consenso -24/-12 a la que se une RpoN, así como las secuencias UAS necesarias para la activación por NifA.

Mediante mutagénesis dirigida con el transposón Tn3::HoHo1 estos mismos autores obtuvieron una serie de mutantes, algunos de los cuales presentaban un retraso en la nodulación de 1 día y además eran menos competitivos que la cepa parental. Todas las

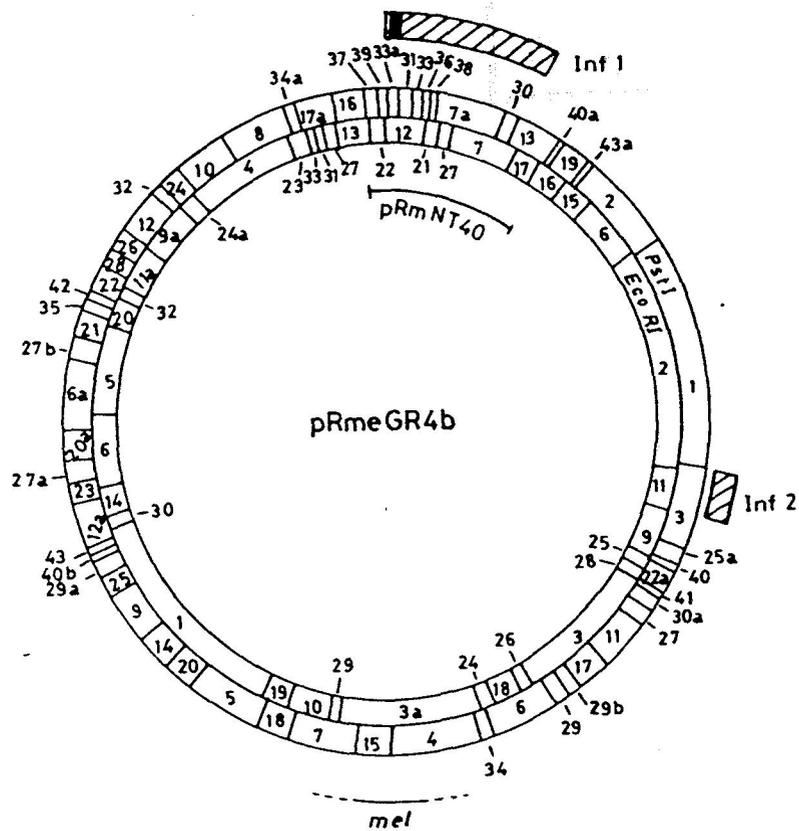


Figura 3.- Mapa de restricción *EcoRI-PstI* del plásmido pRmeGR4b donde se indica la posición del plásmido pRmNT40, así como la localización de las regiones Inf1, Inf2 implicadas en la mayor infectividad y competitividad mostrada por la cepa Rm GR4 (Basado en Sanjuan, 1985). Igualmente se indica la localización de la región implicada en la síntesis de melanina recientemente identificada en nuestro laboratorio (Mercado-Blanco *et al.*,1993).

inserciones que presentaban este fenotipo, se localizaron próximas a los promotores *nif* extendiéndose unas 5 kb (Fig. 4). A esta región, por estar implicada en la infectividad y competitividad para la nodulación de alfalfa, se le denominó *nfe* (*n*odule *f*ormation *e*fficiency). Los mutantes *nfe* mostraron además alteraciones en las propiedades de su polisacárido extracelular, ya que presentaban un fenotipo de colonia más mucoso que la cepa parental y un brillo más acentuado cuando las placas TY+calcoflúor eran iluminadas con luz ultravioleta.

Por otro lado, ensayos de actividad β -galactosidasa de las fusiones Tn3-*lacZ* (Tn3::HoHo1) pusieron de manifiesto, que la actividad sólo era detectable en condiciones microaeróbicas y en nódulos, con fusiones localizadas a la derecha del promotor *nif*, y además cuando el *lacZ* se encontraba en la orientación correcta (izquierda a derecha). Además, cuando dichas fusiones se transfirieron a mutantes *nifA* o *ntrA* de *R. meliloti*, fue imposible detectar actividad β -galactosidasa. Todos estos datos demostraban que la expresión de la región *nfe* era dependiente de *nifA* y *ntrA*, y sugerían la existencia de genes simbióticamente funcionales que se transcribían a partir de un promotor *nif*.

Este no es el único caso de genes rizobianos que no siendo *nif* ni *fix*, su expresión es dependiente de *nifA*. Entre otros, se encuentran los genes *mos* de *R. meliloti* L5-30 y 220-3 que están implicados en la síntesis de una rizopina (Murphy *et al.*, 1988; Murphy *et al.*, 1993; Saint *et al.*, 1993), genes implicados en el desarrollo del bacteroide (Hirsch y Smith, 1987), el gen *melA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* que está implicado en la síntesis de melanina (Hawkins y Johnston, 1988), o la región *ndp* de *B. japonicum* recientemente identificada (Weidenhaupt *et al.*, 1993). Esto apoya el hecho de que el alcance de la misión reguladora de NifA, va más allá de las funciones directamente implicadas en la fijación simbiótica de nitrógeno. La presencia de estas secuencias reguladoras permite el control de genes que no siendo esenciales para la simbiosis, sin embargo pueden tener un papel importante en la interacción simbiótica.

9.2.-Transferencia de la región *nfe* a distintas cepas de *R. meliloti*.

Experimentos de hibridación, utilizando como sonda un fragmento interno a la región *nfe*, pusieron de manifiesto que esta región no se encuentra presente en el genoma de otras cepas de *R. meliloti* como 2011, L5.30, 104A14 o AK631, y además que estos genes no se hallan repetidos en GR4 (Sanjuan y Olivares, 1989).

La no existencia de genes homólogos a los *nfe* en otras cepas de *R. meliloti*, abría posibilidades de que la transferencia de estos genes a dichas cepas pudiese tener un efecto positivo sobre la infectividad y competitividad de las mismas. La transferencia del plásmido pRmNT40 como portador de estos genes, tuvo un efecto diverso entre las distintas cepas. Así, mientras en la cepa 2011 se consiguió un incremento en la competitividad hasta niveles

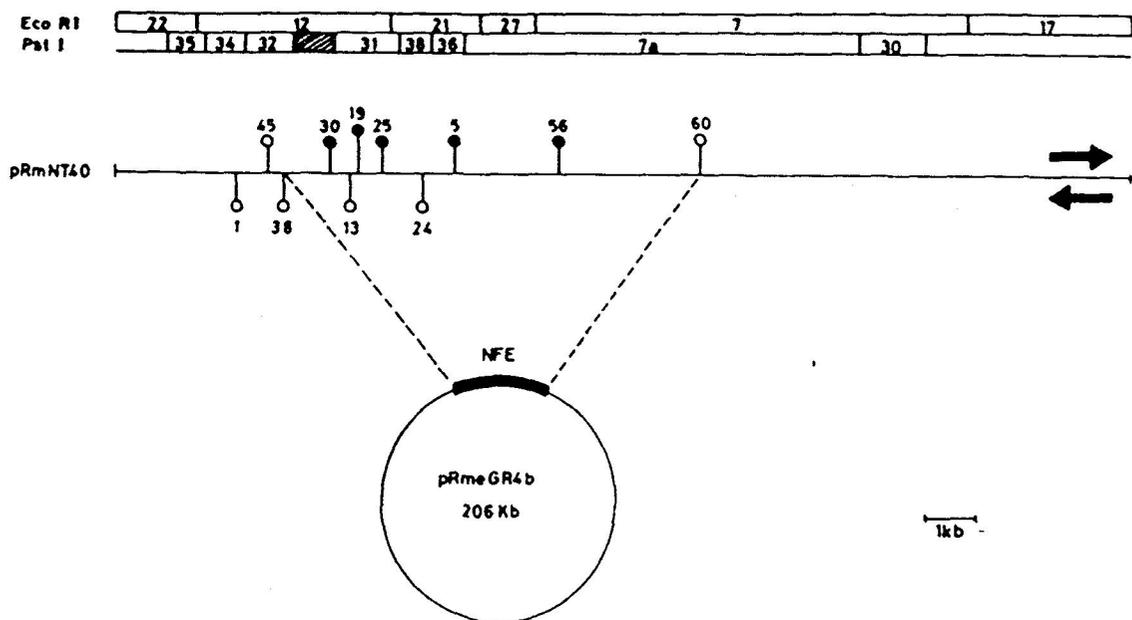


Figura 4.- Localización de inserciones Tn3::HoHo1 obtenidas por Sanjuan y Olivares (1989) dentro de la región de pRmeGR4b clonada en pRmNT40. Las líneas verticales representan las inserciones del transposón. La orientación de *lacZ* en las inserciones representadas arriba de la línea horizontal es de derecha a izquierda, y en las inferiores de izquierda a derecha, como indican las flechas horizontales. Los círculos oscuros corresponden a fusiones *lacZ* que muestran actividad β -gal inducible bajo condiciones de microaerobiosis y en nódulos.

similares a los de GRO13, en la cepa L5.30 no se detectó efecto alguno, y en la cepa 104A14 se observó un efecto ligeramente negativo. Sorprendente fue el caso de AK631, donde la presencia del plásmido pRmNT40 provocó la pérdida del carácter Nod. Estos resultados ponían de manifiesto que la efectividad de los genes *nfe* depende del fondo genético de la bacteria en la que se encuentran.

10.-Secuencias de inserción en *Rhizobium*.

En *Rhizobium*, son varios los genes identificados hasta el momento, que no siendo *nif* ni *fix* presentan una expresión a partir de promotores *nif*. El origen de la aparición de estas secuencias promotoras en regiones que no intervienen en el proceso de fijación biológica de nitrógeno aún se desconoce. No obstante, se sabe que en *Rhizobium* son comunes las reordenaciones en el plásmido Sym que dan lugar a duplicaciones y deleciones. Algunas de ellas dan lugar a la duplicación de fragmentos de gran tamaño, pero también se ha observado la duplicación de genes individuales y de porciones de genes simbióticos, con y sin promotores. En muchos microorganismos, incluyendo especies de *Rhizobium* y *Badyrhizobium* este tipo de reordenaciones genéticas han sido atribuidas a la presencia de secuencias de ADN reiteradas.

En el genoma de los rizobios se pueden detectar varias clases de secuencias de ADN repetidas (Flores *et al.*, 1987). Entre estos elementos se encuentran: duplicaciones de genes y promotores, secuencias reiteradas y secuencias de inserción. Aunque se desconoce el significado biológico de la mayor parte de las duplicaciones de ADN, se sabe que los genes que se hallan en varias copias en *Rhizobium* pueden jugar un papel importante en la simbiosis, como es el caso de *nodD* de *R. meliloti*. Secuencias repetidas se han localizado en las regiones *nod* y *nif* de *R. meliloti* y *B. japonicum*, y en el plásmido simbiótico de *R. fredii* USDA 193. A diferencia de las secuencias de inserción, no se ha podido detectar transposición de estas reiteraciones de ADN.

Las secuencias de inserción (IS), son entidades de ADN relativamente pequeñas (normalmente entre 750 y 1600pb), móviles, y que a diferencia de los transposones con resistencia a determinadas drogas, no contienen genes que puedan ser seleccionados. Esto significa que es imposible detectar directamente la presencia de un elemento IS. Son unidades autónomas, cada una de las cuales codifica sólo las proteínas que requiere para llevar a cabo su propia transposición. Esta, normalmente se detecta por el efecto mutagénico que ejercen tras la integración en el nuevo sitio. Además de sus propiedades genéticas, los elementos IS de procariotas presentan una serie de rasgos estructurales como son la presencia de secuencias repetidas e invertidas en los extremos (IR), y la creación de duplicaciones directas en el sitio de integración (DR) (Iida *et al.*, 1983; Lewin, B., 1990).

Las IR suelen tener un tamaño que oscila entre 15 y 25 pb y no tienen que ser exactamente idénticas. Todas las copias de una determinada IS presentan las mismas IR que serán reconocidas por la transposasa durante el evento de la transposición. Para que se produzca dicha transposición ha de generarse un corte en el ADN diana con objeto de crear un sitio donde la IS se pueda insertar. Tras la unión del elemento a los extremos protuberantes, los huecos han de ser rellenados, originándose así las DR. El tamaño de estas repeticiones directas permanece constante para cada tipo de IS, y suele oscilar entre 5-9 pb.

El mecanismo de la transposición puede conllevar simplemente el movimiento del elemento de un sitio a otro, en cuyo caso se habla de transposición conservativa, o bien puede generarse una nueva copia en cuyo caso se habla de transposición replicativa. Algunos elementos transponibles usan sólo uno de estos mecanismos, mientras que hay otros que son capaces de usar ambos. La frecuencia de transposición es variable entre los distintos elementos, pero suele oscilar entre 10^{-3} - 10^{-4} por elemento y por generación.

Tras su descubrimiento en *E. coli* en los años sesenta, se ha encontrado que estos elementos transponibles son constituyentes normales de los genomas bacterianos, localizándose tanto en el cromosoma como en plásmidos. Se han detectado elementos IS en *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris*, distintas cepas de *Pseudomonas* y en varios rizobios.

El tamaño de las IR que flanquean los elementos IS identificados en *Rhizobium* es variable, siendo de 22, 30 y 41-42 pb, para *ISRm2*, *ISRm3* e *ISR1* respectivamente. De igual forma, también es variable el tamaño de las repeticiones originadas en el nuevo sitio de integración. Así, mientras que *ISR1* origina duplicaciones de 4 pb, *ISRm1* lo hace de 5 pb e *ISRm2* e *ISRm3* de 8-9 pb. El número de ORFs identificados dentro de la secuencia de estos elementos transponibles oscila entre el único ORF identificado en *ISRm3*, el cual presenta homología con las transposasas de IS256 e IST2 de *Staphylococcus aureus* y *Thiobacillus ferrooxidans* respectivamente, y los cinco ORFs identificados en *ISR1*.

Hay dos hechos que caracterizan a las IS en *Rhizobium*. En primer lugar, suelen estar restringidas a una o muy pocas especies de rizobios. *ISRm1* (Ruvkun *et al.*, 1982) que fue primeramente descubierta en *R. meliloti* es un ejemplo de ello. Tan sólo una cepa de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* y dos aislados de alfalfa taxonómicamente intermedios, presentan también esta secuencia (Wheatcroft y Watson, 1988). *ISRm2* (Dusha *et al.*, 1987) e *ISRm3* (Wheatcroft y Laberge, 1991) están distribuidas de forma similar en *R. meliloti*, aunque también ha sido detectada en algunas biovariedades de *R. leguminosarum*. La segunda característica, es que estas secuencias suelen transponer preferencialmente a genes de la nodulación y de la fijación de nitrógeno. De hecho, *ISRm1* e *ISRm2* fueron identificadas como las causas de las mutaciones en genes *nod* en *R. meliloti*, e *ISRm3* fue también detectado como un inactivador natural del gen *nodG* (Ogawa *et al.*, 1991). En otros

casos, las IS en *Rhizobium* fueron detectadas por crear una alta inestabilidad en plásmidos, como es el caso de la ISRI detectada en *R. lupini* (Priefer *et al.*, 1988).

MATERIAL Y METODOS

1.-Razas bacterianas y plásmidos.

Las diferentes cepas de *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Escherichia coli* así como los plásmidos utilizados en el desarrollo de este trabajo se recogen en la Tabla 1 y 2 respectivamente, junto con sus características más relevantes.

2.-Medios de cultivo y de conservación.

2.1.-Medios para Rhizobiaceae.

Para el crecimiento rutinario de *Rhizobium* y *Agrobacterium* se ha utilizado el medio TY (Beringer, 1974):

CaCl ₂ .2H ₂ O	0,9	g
Triptona (DIFCO)	5	g
Extracto de levadura (DIFCO)	3	g
Agua (desionizada)	1000	ml
Agar (PANREAC)(medio sólido)	15	g

Se esteriliza a 115°C durante 30 minutos.

El medio mínimo utilizado para *Rhizobium* ha sido el de Robertsen *et al.*, (1981), modificado:

K ₂ HPO ₄	0,3	g
K ₂ HPO ₄	0,3	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,15	g
CaCl ₂	0,05	g
FeCl ₃	0,006	g
NaCl	0,05	g
Glutamato sódico	1,1	g
Manitol	10	g
Biotina	0,0002	g
Pantotenato cálcico	0,0001	g
Agua (desionizada)	1000	ml
Agar purificado (BBL)(m. sólido)	15	g

El pH se ajusta a 6,8-7,0 y se esteriliza según las condiciones ya indicadas.

La temperatura de incubación para *Rhizobium* y *Agrobacterium* ha sido de 28°C.

TABLA 1. Bacterias utilizadas en este trabajo

Bacteria	Características relevantes	Fuente o referencia
<i>Rhizobium meliloti</i>		
GR4	Cepa silvestre; Nod ⁺ Fix ⁺	Casadesús y Olivares (1979)
GR4SS	Cepa derivada de GR4; Nod ⁺ Fix ⁺ Sm ^r Sp ^r	Este trabajo
GRO13	Cepa derivada de GR4 que carece del plásmido pRmeGR4a	Casadesús y Olivares (1979)
GRO48	Nod ⁺ Fix ⁺ Sm ^r Rif ^r derivada de GRO13	Sanjuan y Olivares (1989)
GRS5	GRO48 con una inserción Tn3::HoHo1 en pRmeGR4b	Sanjuan y Olivares (1989)
GRP4	Cepa derivada de GR4 curada de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b	A. Palomares (1975)
GRM6	Cepa derivada de GR4 curada del plásmido pRmeGR4b	J. Mercado-Blanco
GRM8	Cepa derivada de GR4 curada de los plásmidos pRmeGR4a y pRmeGR4b	J. Mercado-Blanco
GRM10	Cepa derivada de GR4 curada del plásmido pRmeGR4a	J. Mercado-Blanco
2034C	Cepa derivada de GRO13 obtenida por cointegración del plásmido pSMT4 en el ORFC; Sm ^r Tc ^r	Este trabajo
L5.30	Cepa silvestre; Nod ⁺ Fix ⁺	M. Kowalski
41	Cepa silvestre; Nod ⁺ Fix ⁺	A. Kondorosi
102F34	Cepa silvestre; Nod ⁺ Fix ⁺	G. Ditta
2011	Cepa derivada de SU47	J. Denarié
<i>Rhizobium leguminosarum</i>		
bv. <i>trifolii</i> RS1050	Cepa silvestre; Nod ⁺ Fix ⁺	F. Rodríguez-Quñones
bv. <i>phaseoli</i> 8002	Cepa silvestre; Nod ⁺ Fix ⁺	A.W.B. Johnston

TABLA 1. Bacterias utilizadas en este trabajo (Cont.)

Bacteria	Características relevantes	Fuente o referencia
<i>Rhizobium leguminosarum</i>		
bv. <i>viciae</i> VF39	Cepa silvestre; Nod ⁺ Fix ⁺ ; Sm ^r	U. Priefer
<i>Rhizobium</i> spp.		
GRH2	Cepa silvestre aislada de nódulos de <i>Acacia cyanophylla</i> ; Nod ⁺ Fix ⁺	M.A. Herrera
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
A348	Cepa silvestre	E.W. Nester
<i>Escherichia coli</i>		
S17-1	<i>thi, pro, recA, hsdR, hsdM</i> , RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7, Tp ^r , Sm ^r	Simon <i>et al.</i> , (1983)
HB101	<i>pro, leu, thi, lacY, endA, recA, hsdR, hsdM</i> , Sm ^r	Boyer y Roulland-Dussoix (1969)
DH5 α	<i>recA1, endA1, ϕ80d, lacZ, dm15</i>	Bethesda Research Laboratory
K38	HfrC (λ)	Russel y Model (1984)

TABLA 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pRK2013	Replicón ColE1, Km ^r , tra, plásmido movilizador	Figurski y Helinski (1979)
pCK3	pRK290 con nifA de <i>K. pneumoniae</i> , Tc ^r	Buchanan-Wollaston et al., (1981)
pSUP202	pBR325::mob Tc ^r Cm ^r Ap ^r .	Simon et al., (1983)
pUC18	vector de clonaje y secuenciación	Yanish-Perron et al., (1985)
pRmNT40	pRK290 con 21 kb de pRmeGR4b, Tc ^r	Toro y Olivares (1986)
pRmNT40-5, -30, -56	pRmNT40 con inserciones Tn3::HoHo1	Sanjuan y Olivares (1989)
pT7-3	Vector de expresión que contiene el promotor del fago T7. Ap ^r	Tabor y Richardson
pGp1-2	Vector que codifica para la ARN polimerasa del fago T7. Km ^r	Tabor y Richardson
pMB105	Derivado de pT7-3 que contiene el fragmento Hind III de 7,3 kb de pRmNT40	Este trabajo
pMB300/305	Derivados de pT7-3 que contienen el fragmento Sal I de 4,9 kb de pRmNT40 en ambas orientaciones Ap ^r .	Este trabajo
pS2	pUC18 con el inserto Pst I 33a de pRmNT40. Ap ^r	J. Sanjuan (1989)
pSE12/pRSE12	pUC18 con el inserto Eco RI 12 de pRmNT40 en ambas orientaciones. Ap ^r	J. Sanjuan
pSE21/pRSE21	pUC18 con el inserto Eco RI 21 de pRmNT40 en ambas orientaciones. Ap ^r	J. Sanjuan
pSE27/pRSE27	pUC18 con el inserto Eco RI 27 de pRmNT40 en ambas orientaciones. Ap ^r	J. Sanjuan

TABLA 2. Plásmidos utilizados en este trabajo (Cont.)

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pSEO4	pUC18 con el inserto <i>Eco</i> RI O4 de pRmNT40. Cm ^r	Este trabajo
pSM1/pRSM1	pUC18 con el inserto <i>Kpn</i> I- <i>Bam</i> HI de 4,6 kb de pRmNT40 en ambas orientaciones. Ap ^r	Este trabajo
pV1	pUC18 con el inserto <i>Pst</i> I 31 de pRmNT40 Cm ^r	Este trabajo
pSMT4	pSUP202 con el inserto <i>Pst</i> I- <i>Sma</i> I de 452 pb interno al ORFC de GR4	Este trabajo
pCIS4	pUC18 con el inserto <i>Mlu</i> I- <i>Sph</i> I de 0,64 kb interno al clon de secuenciación pS9a, obtenido a partir de pSM1.	Este trabajo

2.2.-Medios para *E. coli*.

Como medio de cultivo rutinario de las cepas de *E. coli* se ha utilizado el medio Luria-Bertani (LB)(Sambrook *et al.*, 1989):

NaCl	5	g
Triptona (DIFCO)	10	g
Extracto de levadura	5	g
Agua (desionizada)	1000	ml
Agar (PANREAC)(m. sólido)	15	g

El medio se esteriliza igualmente a 115°C durante 30 minutos.

La temperatura de incubación para *E. coli* ha sido de 30° o 37°C según cepas y casos.

2.3.-Medios de conservación.

Para la conservación prolongada de cepas se utilizaron criotubos que contenían cultivos crecidos hasta la fase logarítmica tardía adicionados de glicerol estéril a una concentración final del 20%. Los criotubos se congelan rápidamente y se almacenan a una temperatura de -70°C, siendo viables durante varios años.

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 agua-etanol al 50% y esterilizadas a través de unidades de filtración Minisart^R NML (Sartorius) de 0,2 µm de tamaño de poro. Las concentraciones de trabajo fueron las siguientes (mg.l⁻¹): Tetraciclina (Tc, SIGMA), 10; Kanamicina sulfato (Km, BOEHRINGER), 50 para *E. coli* y 180 para *Rhizobium*; Ampicilina (Ap, SIGMA), 200; Cloranfenicol (Cm, SIGMA), 50; Estreptomycin sulfato (Sm, CEPA), 50 para *E. coli* y 250 para *Rhizobium*; Espectinomycin (Sp, SIGMA), 100 para *Rhizobium*.

4.-Selección de mutantes resistentes a antibióticos.

Para la selección de cepas de *Rhizobium* mutantes espontáneas resistente a antibióticos, se tomó 1 ml de una suspensión densa de bacterias (10¹⁰ cel/ml). Tras recoger las células por centrifugación en una microfuga, se resuspendieron en 0,1 ml de TY y se sembraron en placas de petri con medio TY adicionado del correspondiente antibiótico. La placa se incubó a 28°C durante 4-6 días.

5.-Ensayos con planta.

5.1.-Planta.

La planta usada en todos los ensayos fue *Medicago sativa* L. (alfalfa), ecotipo Aragón.

5.2.-Solución nutritiva.

Para los cultivos hidropónicos de alfalfa se ha utilizado la solución libre de nitrógeno de Rigaud y Puppo (1975).

KH ₂ PO ₄	0,2	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2	g
KCl	0,2	g
CaSO ₄	0,12	g
EDTA FeNa ₂	0,025	g
Na ₂ MoO ₄	0,004	g

Microelementos

H ₃ BO ₃	0,018	g
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,020	g
ZnSO ₄	0,030	g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,002	g

El pH se ajusta a 7,5 y se esteriliza a 115°C durante 30 minutos.

5.3.-Esterilización y germinación de semillas de alfalfa.

Las semillas de alfalfa fueron esterilizadas en superficie por inmersión en 2,5% de HgCl₂ durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se lavaron 5-6 veces con H₂O estéril y se dejaron en imbibición durante 2 h. Posteriormente, se extendieron en condiciones asépticas sobre papel de filtro humedecido con H₂O colocado en placas petri, y se dejaron finalmente en oscuridad a 28°C durante 24-48 h.

5.4.-Cultivo axénico de plantas de alfalfa.

Se ha seguido la técnica descrita por Olivares *et al.*, (1980). Cuando las plántulas de alfalfa han alcanzado 1-2 cm de longitud, se colocan en condiciones asépticas en tubos de 20x200 mm que contienen 10 ml de solución nutritiva y un soporte de papel de filtro. Para evitar que la luz incida directamente sobre las raíces, los tubos se cubren en su mitad inferior con papel opaco y se llevan a una cámara de cultivo de plantas mantenida en las siguientes condiciones: 500 μ E/m².s (400-700 nm) de intensidad luminosa, fotoperíodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), 25°C/18°C de temperatura (día/noche) y 50% de humedad relativa.

5.5.-Inoculación de las plantas.

La inoculación de las plántulas de alfalfa se hizo tras 10 días de permanencia en la cámara de cultivo, añadiendo a cada tubo 1 ml de una suspensión bacteriana de la cepa correspondiente (10^7 - 10^8 células/ml).

5.6.-Reaislamiento de *Rhizobium* de los nódulos.

Se tomaron los nódulos de la planta y se esterilizaron en superficie con HgCl_2 al 0,25% durante 4 min. Seguidamente se lavaron con agua estéril 5-6 veces y se trituraron individualmente, en condiciones asépticas, con una varilla de vidrio. Una gota del triturado se extendió sobre placas de medio TY adicionado o no del correspondiente antibiótico, y se incubaron a 28°C 3-4 días.

5.7.-Medida de la competitividad para la nodulación.

Para la determinación del número de nódulos que una raza es capaz de formar en presencia de otra, las plantas de alfalfa fueron inoculadas con suspensiones bacterianas formadas por la mezcla de dos cepas en proporciones 1:1 ó 1:10. En cada mezcla de cepas, al menos una de ellas fue diferenciable de la otra por resistencia a un antibiótico. Para la preparación de los inóculos, se realizó el recuento del número de células viables de un cultivo en fase exponencial de cada cepa en medio TY líquido. El resto del cultivo se conservó en glicerol al 25% a -70°C . Una vez realizados los recuentos y conocido el número de células viables, se tomó de cada cultivo almacenado un volumen adecuado y se diluyó en agua estéril para conseguir una densidad celular de 1×10^7 cel/ml. Las dos suspensiones celulares se mezclaron en proporción 1:1 ó 1:10 (V:V) y la mezcla se utilizó para inocular (1ml/tubo) un mínimo de 25 plantas (5 plantas/tubo). Adicionalmente se realizó un recuento del número de células viables de cada cepa en la mezcla de inoculación, para comprobar que efectivamente ambas cepas estaban representadas en las proporciones esperadas.

Después de 14 días se reaislaron las bacterias de cada nódulo individual (al menos 25 nódulos) en medio TY adicionado o no de los correspondientes antibióticos. El crecimiento bacteriano en cada tipo de medio indicó el porcentaje de nódulos que eran ocupados por cada cepa. Cuando las dos cepas en la mezcla eran resistentes a distintos antibióticos, el crecimiento simultáneo en TY conteniendo uno u otro antibiótico, significa que ambas cepas estaban ocupando el mismo nódulo. En otros casos, cuando sólo una de las cepas en la mezcla estaba marcada por resistencia a un antibiótico, no se determinó el porcentaje de nódulos simultáneamente ocupados por células de ambas cepas. En este caso se consideró que la proporción de este tipo de nódulos era del 15%, que es el porcentaje medio de nódulos ocupados por dos cepas distintas descrito por otros autores (Lindemann *et al.*, 1974; Bromfield y Jones, 1979; Bromfield *et al.*, 1985). Así, en el caso de que dos cepas

fuesen igual de competitivas, aquélla que era positivamente seleccionada, debería de ser recuperada de al menos el 57,5% de los nódulos.

Después de 14 días se reaislaron las bacterias de cada nódulo individual (al menos 25 nódulos) en medio TY adicionado o no de los correspondientes antibióticos. En el caso en el que sólo una de las cepas se encontraba marcada por resistencia a un antibiótico, se consideró que la proporción de nódulos ocupados por ambas cepas era del 15%, que es el porcentaje medio de nódulos ocupados por dos cepas distintas descrito por otros autores (Lindemann *et al.*, 1974; Bromfield y Jones, 1979; Bromfield *et al.*, 1985). Así, en el caso de que dos cepas fuesen igual de competitivas, aquélla que era positivamente seleccionada, debería de ser recuperada de al menos el 57,5% de los nódulos.

6.-Métodos de conjugación.

6.1.-Cruces simples.

Se realizaron por mezcla de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento del donador con otro en fase exponencial tardía del receptor, habitualmente en la proporción 1:1. Donador y receptor se centrifugaron en un tubo de microfuga y se resuspendieron en un pequeño volumen de medio de cultivo (50-200 μ l). La mezcla se deposita sobre un filtro Millipore estéril de 0,45 μ m de poro y 2,5 cm de diámetro, previamente colocado sobre una placa de TY-agar, y se incuba durante 16-24 h a 28°C. Transcurrido este tiempo, la mezcla de conjugación se resuspende en medio estéril y se efectúan las correspondientes diluciones, sembrándolas sobre placas con los medios adicionados de los antibióticos apropiados.

Alternativamente se han hecho mezclas de donador y receptor sobre medio TY-agar o en un tubo de microfuga con una pequeña cantidad de medio líquido (50 μ l). Después de incubar el tiempo antes indicado, se sembraron porciones de la mezcla sobre medios adicionados de los correspondientes antibióticos.

Este tipo de cruces se efectuaron para movilizar plásmidos que contienen la región *mob* de RP4 (pSUP102 y pSUP202); para ello se utilizó como cepa donadora y movilizadora *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983), que contiene y expresa los genes de transferencia (*tra*) de RP4 integrados en el cromosoma.

6.2.-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 biparentales, pero en estos casos se efectuaron mezclas donador:movilizador:receptor en proporciones que habitualmente fueron 1:1:1.

7.-Aislamiento y purificación de ADN plasmídico.

7.1.-Aislamiento a gran escala de plásmidos de bajo peso molecular.

Para el aislamiento a gran escala de plásmidos recombinantes se ha utilizado el procedimiento de lisis alcalina indicado en Sambrook *et al.*, (1989) a partir de Birboim y Doly (1979) e Ish-Horowicz y Burke (1981).

Se inocula un matraz de medio LB a partir de un cultivo iniciador (1 ml/100 ml). Tras incubar en agitación a 37°C durante una noche, las células se recogen por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min en rotor GSA (4.100 x g). Cada 250 ml de cultivo es resuspendido en 25 ml de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTANa₂ 10 mM) a la que se ha añadido inmediatamente antes de usar 5 mg.ml⁻¹ de lisozima. Posteriormente se añaden 50 ml de solución II (NaOH 0,2 M, SDS 1%), recién preparada y se mezcla, dejando 5 min en hielo o hasta observar la aparición de un lisado completo. Transcurrido ese tiempo se añaden 37 ml de solución III (para 100 ml de solución: 60 ml acetato potásico 5 M, 11,5 ml de ácido acético glacial y 28,5 ml de agua), mezclándose por inversión y dejando en hielo durante 30 min. Para finalizar se centrifuga a 6.000 rpm (5.900 x g) durante 20 min a 4°C y se pasa a un nuevo tubo filtrando el sobrenadante mediante una gasa estéril. Se añade un volumen igual de isopropanol, mezclando bien y dejando a -20°C al menos 20 min. El ADN plasmídico se recoge centrifugando 30 min a 6.000 rpm (5.900 x g), y se deja secar el máximo posible al vacío. Posteriormente se resuspende en tampón TE8 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) y se procede a su purificación en gradiente de cloruro de cesio.

7.2.-Purificación de ADN plasmídico en gradiente de cloruro de cesio.

La purificación de los ADN plasmídicos obtenidos por el procedimiento anterior se hizo por ultracentrifugación en gradientes de cloruro de cesio.

A cada mililitro de la suspensión de ADN en tampón TE8 se añade 1,2 gramos de CsCl y posteriormente 0,8 ml de una solución de bromuro de etidio (10 mg.ml⁻¹) por cada 10 ml de la solución de CsCl (la concentración final del bromuro de etidio será de 400 µg.ml⁻¹). La mezcla se centrifuga a 10.000 rpm (12.000 x g) durante 30 min en rotor SS-34. El sobrenadante obtenido se transfiere a un tubo de polialómero (Quick-Seal de BECKMAN) para la ultracentrifugación en un rotor 50Ti. La velocidad y el tiempo de centrifugación fueron de 40.000 rpm y 40 h. Terminada la ultracentrifugación se recoge la banda de ADN plasmídico mediante punción con aguja. Para una mejor visualización, se iluminó con lámpara UV a 380 nm. Para eliminar el bromuro de etidio se adicionaron volúmenes iguales de isopropanol saturado con agua (9 volúmenes isopropanol:1 volumen H₂O), o alternativamente, butanol saturado con agua (1:1), mezclándose las dos fases y extrayendo la fase superior, alcohólica. Este paso se repite varias veces hasta que

desaparezca el color rosa (3-5 veces). La solución acuosa se reparte en tubos eppendorf en volúmenes de 150 μ l. Por último, el ADN plasmídico se precipita por adición de 2 volúmenes de agua (300 μ l) y 6 volúmenes de etanol, a -20°C durante 2 h y se recoge por centrifugación a 15.000 rpm en una centrífuga Microspin 24 (SORVALL). Después de un lavado con etanol al 70% y posterior centrifugación se seca el ADN al vacío y se resuspende en tampón TE8, dividiéndose en alícuotas y conservándose a -20°C .

7.3.-Minipreparación de plásmidos.

El aislamiento rápido de plásmidos recombinantes de bajo peso molecular a partir de transformantes o transconjugantes se realizó siguiendo el mismo proceso de lisis alcalina descrito en el apartado 6.1, con las adecuadas reducciones de volúmenes.

Se partió normalmente de 1,5 ml de cultivo y después de recoger las células por centrifugación en tubos eppendorf, se resuspendieron en 100 μ l de la solución I (ver apartado 6.1). Se deja 5 min a temperatura ambiente, se añaden 200 μ l de la solución II, se agita invirtiendo el tubo y se deja 5 min en hielo. Posteriormente se adicionan 150 μ l de solución III y después de agitar igualmente por inversión se deja otros 5 min en hielo. Se centrifuga a 15.000 rpm en la centrífuga Microspin y al sobrenadante (400 μ l), se le añade un volumen igual de una solución de fenol-cloroformo (1:1), siendo el cloroformo una mezcla de isoamílico:cloroformo 1:24. La mezcla de fenol contiene 100% fenol; 0,1% 8-hidroxiquinoleína en Tris-HCl 0,1 M pH 8. La mezcla se mantiene en agitación durante una noche y posteriormente se deja decantar. Tras mezclar bien se separan las dos fases por centrifugación a 15.000 rpm 5 min y el sobrenadante (fase acuosa) se transfiere a un nuevo tubo al que se añaden 2 volúmenes de etanol 100% a -20°C . Se mezcla y se deja precipitando 15 min a -70°C . Se centrifuga 15 min a 15.000 rpm y el precipitado se lava con etanol al 70% y vuelve a centrifugar durante 3 min. Por último se deseca al vacío y se resuspende en tampón TE8 (25 μ l).

El ADN así obtenido puede usarse para diversas manipulaciones. En el caso de querer eliminar el ARN presente se puede tratar con ARNasa (1 μ l) de una solución concentrada (10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 15 mM. (Esta solución concentrada se calienta a 100°C durante 15 min dejándose enfriar lentamente a temperatura ambiente y se almacena en alícuotas a -20°C).

7.4.-Purificación con GeneClean del ADN obtenido por Minipreps.

Para obtener un ADN suficientemente limpio como para ser secuenciado en condiciones óptimas se procedió a la purificación de los ADNs obtenidos por Minipreps usando el kit comercial GeneClean^R Bio 101 Inc., siguiendo las recomendaciones indicadas por los proveedores.

A la solución de ADN (300 μ l) se le añade 3 volúmenes de NaI. Tras agitar, se añade 5 μ l de Glassmilk (aportado por el kit) por cada 5 μ g o menos de ADN existente en la solución, añadiendo 1 μ l adicional por cada 0,5 μ g de ADN que exceda a los 5. Después de mezclar, la solución se deja en hielo durante al menos 5 min para permitir que el ADN se una a la matriz, agitando cada 1-2 min para asegurarnos de que no precipite el Glassmilk. A continuación se sedimenta la matriz mediante centrifugación en una microfuga durante unos 5 seg, y tras eliminar el sobrenadante, el precipitado que contiene el ADN unido a la matriz se lava 3 veces con la solución New Wash fría (500 μ l) aportada también por el kit. Tras eliminar el último sobrenadante, el ADN se eluye resuspendiendo el precipitado en 10 μ l de agua bidestilada o tampón TE, y calentando a 55°C durante 3 min. Después de una centrifugación de 30 seg en una microfuga, el sobrenadante se recoge con cuidado y se pasa a un nuevo tubo. Esta operación se repite una segunda vez para eluir el ADN restante.

7.5.-Magic Minipreps.

Alternativamente al procedimiento detallado en el apartado anterior, se procedió a la purificación de los ADNs usando el kit comercial de purificación "Magic MiniprepsTM" de PROMEGA, el cual tiene la ventaja de proporcionar material para secuenciar de una forma mucho más rápida (15 min) . Se siguieron las indicaciones del fabricante: Se centrifugaron en un tubo eppendorf células procedentes de un cultivo de 3 ml. Después de una lisis alcalina llevada a cabo con las soluciones de suspensión, lisis y neutralización (200 μ l de cada una por tubo) que son aportadas por el kit, se centrifuga el lisado obtenido a 15.000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se lleva a un nuevo tubo, al que se le añade 1 ml de resina de purificación, mezclándose bien. Esta mezcla se carga sobre el barril de una jeringa acoplado a una minicolumna a la que posteriormente se le hace pasar 2 ml de solución de lavado. Efectuado este paso, se les extrae todo el líquido a las columnas por centrifugación a 15.000 rpm 20 seg acopladas a un tubo de microfuga. Finalmente el ADN plasmídico se eluye haciendo pasar por centrifugación durante otros 20 seg, 50 μ l de agua o tampón TE8 precalentados a 65-70°C.

8.-Aislamiento de ADN total.

El aislamiento de ADN total se hizo según un método especialmente diseñado para *Rhizobium* en el departamento de Genética de la Universidad de Bielefeld (Alemania). De un cultivo bacteriano en fase logarítmica de la cepa elegida se toman 1,5 ml y se centrifugan durante 2 min en una microfuga. Las células se lavan con 0,5 ml de tampón TE8 adicionado de N-lauroil sarcosina al 0,1%. Después se resuspenden las células en 1 ml de NaCl 1 M y la suspensión se deja aproximadamente 2 h a 4°C, agitando de vez en cuando. Se centrifuga durante 2 min, se elimina el sobrenadante y el sedimento se resuspende hasta homogeneidad

en 0,25 ml de sacarosa al 20% en TE. Después se adiciona 0,25 ml de TE con lisozima (5 mg/ml), se agita por inversión, incubándose durante 30 min a 37°C. Pasado este tiempo, se adicionan 0,1 ml de TE con N-lauroil sarcosina al 5% y pronasa 10 mg/ml dejándose incubar una hora más a 37°C. Posteriormente, se adicionan 70 µl de acetato sódico 3 M, pH 5,2; 0,2 ml de mezcla fenol/cloroformo y 0,2 ml de mezcla de fenol (Ver apartado 6.3). Se agita en vortex y se centrifuga durante 5 min recogiendo a continuación la fase superior acuosa. A esta última, se adiciona 0,3 ml de cloroformo, se agita de nuevo en vortex centrifugando a continuación durante 5 min. La fase superior se recoge en un nuevo tubo y se le adiciona 0,7 ml de isopropanol enfriado a -20°C, se mezcla bien y se deja durante 15 min a -70°C. Después se centrifuga durante 15 min, el precipitado se lava con 0,5 ml de etanol al 70%, se seca al vacío y se resuspende en 50 µl de 1/10 TE8.

9.-Determinación de la concentración de ADN, ARN y oligonucleótidos.

Se ha seguido el método espectrofotométrico descrito en Sambrook *et al.* (1989). Se mide la absorbancia de la solución de ADN o ARN en agua o en TE a 260 y 280 nm utilizando como blanco agua o TE sin ADN. La concentración en la muestra se calcula respecto a los valores estándar de DO_{260nm} 1 para soluciones con 50 µg/ml de ADN de cadena doble, 40 µg/ml de ADN de cadena sencilla o ARN, y 20 µg/ml de oligonucleótidos. La relación DO_{260nm}/DO_{280nm} se usa como estimador de la pureza de la preparación, considerándose valores por debajo de 1,8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol. Para muestras de ADN muy impuras o de baja concentración, se empleó el método de comparación de fluorescencia en gel de agarosa bajo luz UV frente a marcadores de ADN de concentración conocida, también descrito por Sambrook *et al.* (1989).

10.-Manipulación enzimática de ADN.

10.1.-Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción.

La digestión de ADN se ha llevado a cabo en las condiciones óptimas para cada enzima de restricción, siguiendo las indicaciones de temperatura y tampón recomendadas por los proveedores (BOEHRINGER y PROMEGA).

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

10.2.-Relleno de extremos 3' 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' mediante el uso del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (BOEHRINGER). Se siguieron las indicaciones de Sambrook *et al.*, (1989), añadiendo a la digestión (20 µl) 1 µl de una solución de dNTPs (1 mM) y una unidad de Klenow por 1 µg de ADN, dejando incubar durante unos 15 min a temperatura ambiente. La Klenow fue inactivada mediante extracción con mezcla fenol:cloroformo y posterior precipitación del ADN de la solución acuosa con 0,1 volúmenes de AcNa 3 M y 2 volúmenes de etanol 100%.

10.3.-Eliminación de extremos 3' 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 igualmente siguiendo las instrucciones de Sambrook *et al.*, (1989). Al volumen de digestión, se añade 1 µl de una solución de dNTPs (2 mM) y 1-2 unidades de ADN polimerasa de bacteriófago T4 (BOEHRINGER) por microgramo de ADN presente en la reacción, incubando durante 15 min a 12°C. La polimerasa fue inactivada al igual que en el apartado anterior, mediante extracción con fenol:cloroformo.

10.4.-Ligación de fragmentos de restricción.

Las reacciones de ligación se efectuaron usando unas relaciones molares vector:inserto variables dependiendo del tamaño de los fragmentos o de si se trataba de la ligación de extremos cohesivos o romos. En cualquier caso, el volumen final de la reacción fue de 20 µl. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de la enzima T4 DNA ligasa (BOEHRINGER) y en el tampón indicado por los proveedores, incubando 3-4 h a temperatura ambiente o, alternativamente, durante una noche a 12°C. Cuando se trataba de la ligación de extremos romos, se adicionó en algunos casos PEG a una concentración final del 15%.

11.-Electroforesis de ADN.

11.1.-Separación e identificación de fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa.

La separación de fragmentos de restricción se ha llevado a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (SIGMA tipo I) al 0,7% sumergidos en TBE (Tris 89 mM, EDTANa₂ 2,5 mM, BO₃H₂ 89 mM, pH 8,2). El voltaje usual de trabajo ha sido de 120 V. Como solución de carga se ha utilizado sacarosa 40% y azul de bromofenol 0,25% en una relación 5 µl solución de ADN/1 µl solución de carga.

11.2.-Revelado de geles y fotografía.

Los geles de agarosa se revelan sumergiéndolos en agua a la que previamente se añaden unas gotas de solución de bromuro de etidio (1 mg.ml^{-1}), durante 15-20 min. Posteriormente se observa con luz UV de 260 nm en un transiluminador. En algunas ocasiones el colorante se ha incorporado al gel para seguir la marcha del proceso.

Las fotografías de los geles se han realizado con una cámara NIKON FE2 y película Kodak Tri X-PAN de 400 ASA o alternativamente, con cámara POLAROID MP-4 y película POLAROID tipo 667, siempre con filtro rojo.

11.3.-Estimación de los pesos moleculares de fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa.

La determinación del tamaño de fragmentos de restricción se ha efectuado a partir de la construcción de gráficas en las que se representa el logaritmo del peso molecular frente a la movilidad relativa (distancia de migración dividida por la longitud del gel), utilizando como patrones los marcadores de peso molecular de tipo II (fragmentos de ADN de fago lambda resultantes de la digestión con endonucleasa *HindIII*) o tipo III (fragmentos de ADN de fago lambda resultantes de la digestión con endonucleasas *EcoRI* y *HindIII*), ambos de BOEHRINGER.

11.4.-Purificación de fragmentos de restricción por transferencia desde geles de agarosa a membranas de DEAE-celulosa.

Cuando fue necesaria la obtención de fragmentos de restricción puros para ser usados como sonda en experimentos de hibridación o para ser clonados, se siguió el método de unión a papel DEAE-celulosa NA45 (SCHLEICHER & SCHUELL) descrito en Sambrook *et al.* (1989).

Después de efectuar la electroforesis en gel de agarosa y de la correspondiente tinción con bromuro de etidio, se visualizan las bandas con lámpara UV de 360 nm, y se hace un corte profundo con escalpelo inmediatamente delante de la banda deseada. En él se introduce la membrana de DEAE-celulosa previamente tratada. Para ello se mantiene durante varias horas en una solución de NaCl 1,5 M y después de lavar varias veces con agua se conservan en una solución de EDTA Na_2 1 mM durante varias semanas a 4°C . Inmediatamente antes de ser usadas se equilibran en tampón de electroforesis TBE durante al menos 20 min. Se vuelve a reanudar la electroforesis, con cuidado de no sumergir el gel, durante un tiempo suficiente para permitir la adhesión del ADN a la membrana. Posteriormente se introduce la membrana en un tubo de microfuga con la cara que contiene el ADN hacia la luz del tubo, se añaden 300 μl de tampón de elución (NaCl 1 M, EDTA Na_2 0,1 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8) e incuba durante 1 h a $65-68^\circ\text{C}$, agitando de vez en cuando. Una vez comprobado que el

ADN se ha eluído mediante observación de la membrana a luz UV, se precipita el ADN mediante adición de 2,5 volúmenes de etanol 100% a -20°C durante varias horas, prosiguiendo tal y como se indica en el apartado 7.3.

11.5.-Purificación de fragmentos de restricción de geles de agarosa por el método "Magic PCR Preps™" de PROMEGA.

Alternativamente, el proceso de purificación de los fragmentos de restricción se llevó a cabo usando el kit comercial "Magic PCR Preps™" de PROMEGA, siguiendo las instrucciones del fabricante. La electroforesis se realizó en geles de agarosa de bajo punto de fusión (BOEHRINGER) al 0,7%. Finalizada la electroforesis, y tras la tinción con bromuro de etidio, las bandas se visualizaron con una lámpara de UV de 360 nm. Con un escalpelo, se extrajo el fragmento de agarosa que contenía la banda de ADN deseada, y se colocó en un tubo eppendorf. La muestra se incubó a 70°C hasta que la agarosa estuvo completamente fundida (aproximadamente 2 min), tras lo cual se le añade 1 ml de la resina de purificación (aportada en el kit) mezclándose bien por inversión del tubo durante 1 min. Esta mezcla se carga sobre el barril de una jeringa a la que se ha acoplado una minicolumna. El resto del proceso se llevó a cabo como se detalla en el apartado 7.4.

12.-Preparación de células competentes y transformación de *E. coli*.

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

Partiendo de un cultivo iniciador de la cepa de *E. coli* a transformar se inocula un matraz de medio LB y se incuba en agitación a 37° hasta que el cultivo alcanza una DO₆₀₀ de 0,6. Tras dejar enfriar en hielo se centrifuga a 10.000 rpm (12.000 x g) 5 min a 4°C en un rotor SS-34. Las células se resuspenden en un volumen igual de MgCl₂ 0,1 M frío y se centrifugan a 5.000 rpm (3.000 x g) 5 min a 4°C. A continuación se resuspenden en 1/2 volumen de una solución de CaCl₂ 0,1 M frío. Tras dejarlas en hielo un mínimo de 30 min, las células se vuelven a centrifugar a 3.000 x g 5min a 4°C y se resuspenden suavemente en 1/10 volumen de CaCl₂ 0,1 M, 20% glicerol frío. Se reparten en alícuotas de 200 µl en tubos eppendorf preenfriados y se conservan a -70°C. La competencia de las células se mantiene de esta forma durante varios meses.

Para la transformación de células competentes con ADN plasmídico se siguió la técnica descrita por Rodríguez y Tait (1983) modificada. A alícuotas de 200 µl de células competentes se le añade ADN (0,05-0,5 µg) y la mezcla se deja en hielo 30 min. Posteriormente se le somete a un choque de calor (5 min a 37°C). Se deja 5 min en hielo, y se le añade 1 ml de LB, incubándose a 37°C durante al menos 60 min. Transcurrido este

tiempo se siembran alícuotas de 0,1 ml en placas de LB adicionado del correspondiente antibiótico.

13.-Electroporación de *E. coli* y *Rhizobium*.

13.1.-Preparación de las células de *E. coli*.

Partiendo de un cultivo iniciador de la cepa de *E. coli*, se inocula un matraz de medio LB y se incuba a 37°C en agitación hasta que el cultivo alcance una DO₆₀₀ de 0,5-1. Tras dejar enfriar en hielo, las células se recogen por centrifugación a 4.000 x g a 4°C, 15 min. Las células se resuspenden entonces en 1, 0,5, 0,5 y finalmente 0,2 volúmenes de agua estéril y fría, centrifugando en cada paso a 4.000 x g 15 min a 4°C. Después de la última centrifugación, las células se resuspenden en 0,002-0,003 volúmenes de agua estéril y fría con glicerol al 10% (esterilizado por filtración). Las células así preparadas se conservan en alícuotas, congeladas a -70°C.

13.2.-Preparación de las células de *Rhizobium*.

El método de preparación de células de *Rhizobium*, está basado en el de Hatlemann, D. y Stacey, G. (1990). Se inocula un matraz de TY con un preinóculo de la cepa de *Rhizobium* que va a ser electroporada, y se incuba a 30°C en agitación hasta que el cultivo alcance una DO₆₀₀ de 0,4-0,6. Tras dejar enfriar en hielo durante 15-30 min, las células se recogen por centrifugación a 9.820 x g 10 min a 4°C. Las células se resuspenden en 1, 0,5, 0,5 y 0,2 volúmenes respectivamente de agua estéril y fría, centrifugando entre cada paso a 9.820 x g, 10 min a 4°C. Finalmente, las células se resuspenden en 0,003 volúmenes de agua estéril y fría con glicerol al 10% (esterilizado por filtración), y se guardan en alícuotas congeladas a -70°C.

13.3.-Electroporación.

La electroporación de células de *E. coli* y *Rhizobium* se llevó a cabo utilizando un electroporador (ELECTRO CELL MANIPULATOR 600, BTX Electroporation System). Tras descongelar las células en hielo durante 5-10 min, se mezcló 39 µl de la suspensión de células con 1 µl de la suspensión de ADN (1 ng/ µl en agua o TE) con la que se quería transformar. La mezcla resultante (40 µl) se colocó en una cubeta de electroporación preenfriada. La cubeta tenía un grosor de 2 mm para el caso de *E. coli*, y de 1mm para el de *Rhizobium*, siendo las condiciones de electroporación de 2,45 y 1,3 kV respectivamente. Una vez aplicada la carga eléctrica, rápidamente se le añade 960 µl de LB o TY, se agita suavemente y se deja incubar 1 h a 37°C (*E. coli*) o 4-20 h a 30°C (*Rhizobium*). Transcurrido ese tiempo, se siembran alícuotas en placas de LB o TY respectivamente, adicionadas del correspondiente antibiótico.

14.-Experimentos de hibridación ADN-ADN.

14.1.-Transferencia de ADN a filtros de nylon.

La transferencia de fragmentos de restricción de ADN plasmídico o total a filtros de nylon se realizó según la técnica de Southern (1975).

Los fragmentos de restricción se separan por electroforesis en gel de agarosa. Una vez fotografiado el gel y medidas sus dimensiones se procede a su tratamiento que consiste, siempre con agitación, en un paso de 20 min de depurinación ácida del ADN mediante inmersión en una solución de HCl 0,25 M. Tras lavar varias veces con agua destilada, se procede a desnaturalizar en una solución de NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M, en dos pases de 15 min y por último se neutraliza con una solución de Tris-HCl 0,5 M, NaCl 3 M pH 7,0 otros dos pases de 15 min. Después de lavar el gel con agua destilada se coloca sobre una superficie regular cubierta con papel Whatman 3MM que funciona a modo de mecha conectado con un reservorio de tampón de transferencia 20xSSC (1xSSC: NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM, pH 7,0). Sobre el gel se coloca un filtro de nylon (BOEHRINGER) y tres piezas de Whatman 3MM de tamaño similar al gel (el filtro y las piezas Whatman se saturan previamente en el tampón de transferencia 20xSSC durante 30 min). Sobre todo este dispositivo se colocan varias piezas de papel de celulosa y sobre éstas peso suficiente para mantener ligeramente comprimido el sistema. Las transferencias se completaron normalmente en 12-16 h.

Una vez finalizada la transferencia, el filtro de nylon se lava en una solución de 2xSSC para eliminar restos de agarosa, se seca a temperatura ambiente y se cuece al vacío durante 20 min a 120°C.

14.2.-Marcaje de sondas de ADN para hibridación.

El marcaje de sondas y los protocolos de hibridación han sido realizados siguiendo las recomendaciones del kit de marcaje y detección no radiactivos de BOEHRINGER. Los ADNs usados como sonda fueron fragmentos purificados en membranas de DEAE-celulosa (apartado 11.4) o usando el kit Magic PCR Preps de PROMEGA (apartado 11.5), o bien plásmidos intactos o digeridos según las necesidades de cada experimento.

La preparación de sondas de ADN no radiactivas consiste en la síntesis parcial de ADN a partir del ADN molde que se quiere usar como sonda, usando una mezcla de hexanucleótidos como cebadores, fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y la incorporación de digoxigenina-dUTP como nucleótido marcado.

Las reacciones de marcaje se hicieron habitualmente con 2 µg de ADN desnaturalizado en un volumen de reacción de 20 µl. El tiempo de incubación fue siempre superior a la hora y habitualmente durante toda la noche a 37°C.

14.3.-Hibridación ADN-ADN con sonda no radiactiva.

Igualmente se siguieron las indicaciones del kit antes mencionado. El filtro de nylon se incubó en una solución de prehibridación (20 ml/100 cm²) compuesta de 5xSSC; N-lauroil sarcosina 0,1%; SDS 0,02%; formamida 50% y agente bloqueante al 2% a 42°C durante al menos 3 h. Esta solución se sustituye por la solución de hibridación (5 ml/100 cm²), que es la misma a la que se ha añadido el ADN sonda desnaturalizado, y se incuba a 42°C un mínimo de 6 h.

Terminada la hibridación se lavan los filtros siguiendo las recomendaciones de los proveedores, y posteriormente se lleva a cabo la detección inmunológica.

La detección no radiactiva de las bandas de hibridación se efectuó usando el protocolo de detección quimioluminiscente tal y como indican los proveedores. La impronta de las señales se realizó sobre películas Kodak X-OMAT. Las bandas de hibridación aparecen en un intervalo entre los 5 min y las 3 h.

Para el revelado de las películas se usó revelador Neutol Liquid NE (AGFA) y fijador N FIX 172 (NEGRA) a las diluciones y tiempos recomendados por las casas comerciales.

15.-Secuenciación de ADN de cadena doble.

15.1.-Obtención de los plásmidos de secuenciación. Estrategia.

Para la secuenciación de la región *nfe* delimitada por las inserciones Tn3-HoHo1, se utilizaron los plásmidos pSE12/pRSE12, pS2, pSE21/pRSE21, pSE27/pRSE27, pSE04 y pSM1/pRSM1, indicados en la Fig. 5. Salvo para los plásmidos pSE04 y pS2, que fueron secuenciados directamente utilizando los cebadores M13(-40) y el M13 reverso, para los demás se obtuvieron subclones derivados mediante la generación de delecciones unidireccionales con el sistema de delección exonucleasa III/nucleasa S1 (PROMEGA). Las estrategias seguidas se muestran en la Fig. 6.

Los plásmidos pSE27/pRSE27 y pSM1/pRSM1 (5-10 µg) se sometieron a doble digestión con las restrictasas *Bam* HI y *Pst* I. *Bam* HI deja extremos 5' cohesivos susceptibles de ser atacados por la Exonucleasa III, y *Pst* I extremos 3' cohesivos que actuaron de extremo protegido. En el caso del plásmido pV1, las digestiones se llevaron a cabo con *Bam* HI para poder atacar con Exonucleasa III y con *Sac*I para proteger el extremo contrario. Los plásmidos pSE21/pRSE21 se digirieron con *Bam* HI y *Hind*III. Esta última también rinde extremos 5' cohesivos, por lo que fue necesario proteger de la actuación de la Exonucleasa III mediante la incorporación de nucleótidos α-fosforotioados según las indicaciones del kit. Por último, los plásmidos pSE12/pRSE12 se sometieron a digestiones con las endonucleasas *Sma*I (deja extremos romos susceptibles también de ser atacados por la Exonucleasa III) y *Xba*I que al dejar extremos 5' cohesivos tuvo que ser protegido con los nucleótidos modificados.

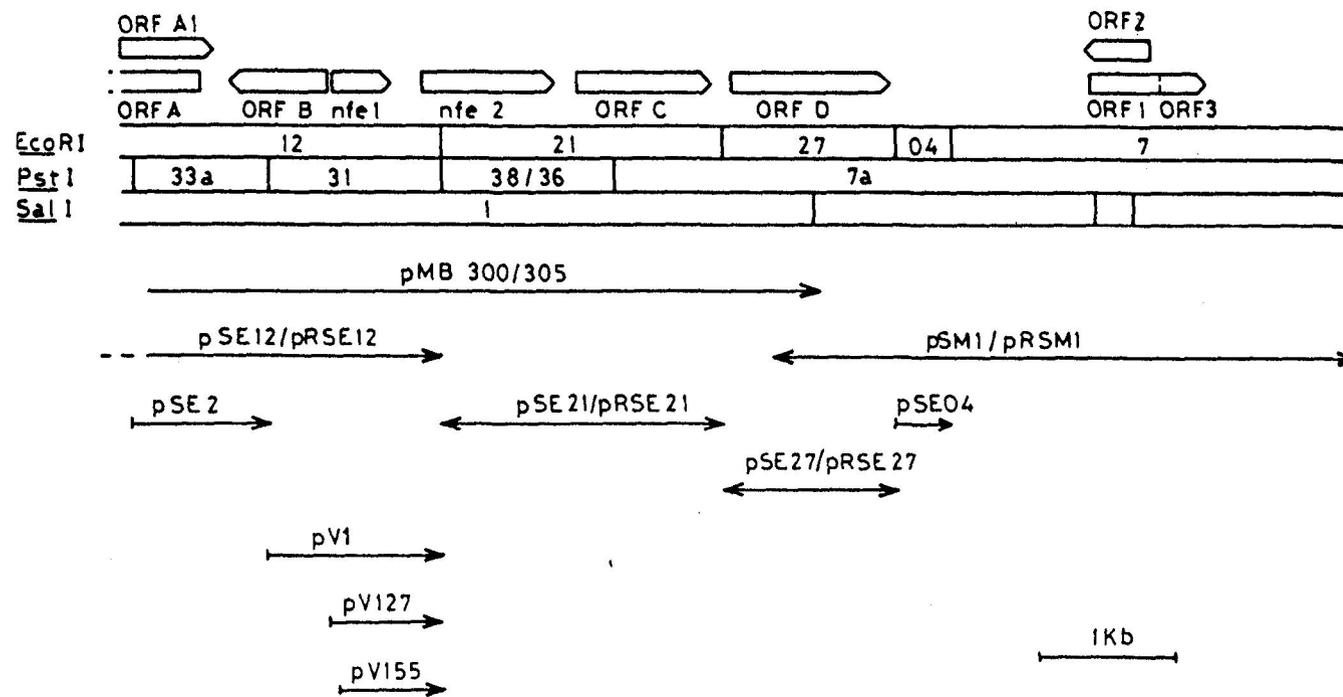


Figura 5.- Mapa físico de la región *nfe*. Se representan los diez posibles ORFs deducidos de la secuencia así como el sentido de su transcripción. En la parte inferior de la Figura se indican los fragmentos de ADN clonados y utilizados como fuente primaria para la secuenciación y/o el estudio de la expresión de la región *nfe*. Las dobles flechas representan clones en las dos orientaciones.

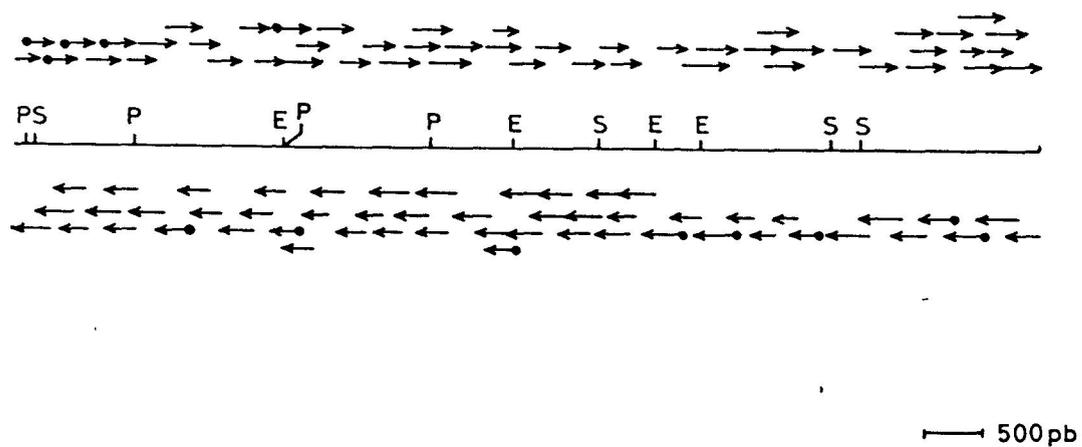


Figura 6.- Estrategia seguida para la secuenciación de la región *nfe*. Las flechas horizontales indican la extensión y dirección del ADN secuenciado a partir de clones individuales. Las flechas con un círculo sólido representan secuenciación a partir de oligonucleótidos sintéticos. Se representa también un mapa de restricción con los sitios más representativos. P, *Pst*I; S, *Sal*I; E, *Eco*RI.

