

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

**El Intrón del Grupo II de *Sinorhizobium meliloti*,
RmInt1: Estudios Ecológicos y Caracterización
Molecular de las Actividades Bioquímicas
Implicadas en su Movilidad**

Estefanía Muñoz Adelantado

Estefanía Muñoz Adelantado

02/03

Tesis Doctoral
2003



Biblioteca Universitaria de Granada



01080883

T 7/53

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 24-09-03
ENTRADA NUM.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE GRANADA
25 FEB. 2003
COMISION DE DOCTORADO

**El Intrón del Grupo II de *Sinorhizobium meliloti*,
RmInt1: Estudios Ecológicos y Caracterización
Molecular de las Actividades Bioquímicas
Implicadas en su Movilidad**

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento 613655267
N.º Copia 115726927

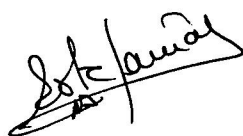
Estefanía Muñoz Adelantado

Tesis Doctoral

2003

**El Intrón del Grupo II de *Sinorhizobium meliloti*, RmInt1:
Estudios Ecológicos y Caracterización Molecular de las
Actividades Bioquímicas Implicadas en su Movilidad**

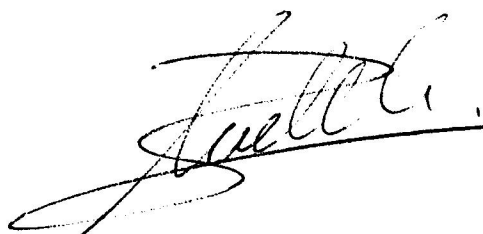
Memoria que presenta la licenciada en Ciencias
Biológicas Dña. Estefanía Muñoz Adelantado
para aspirar al grado de Doctor



Fdo: *Estefanía Muñoz Adelantado*

V° B°

El Director



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

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Grupo de Ecología Genética de la Rizosfera, del Departamento del Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín. (C.S.I.C.)

Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido publicados o aceptados en las siguientes revistas internacionales:

Muñoz, E., Villadas, P.J. y Toro, N. (2001) Ectopic transposition of a group II intron in natural bacterial populations. *Mol. Microbiol.* 41:645-652.

Willems, A., Fernández-López, M., Muñoz-Adelantado, E., Goris, J., De Vos, P., Martínez-Romero, E., Toro, N. y Gillis, M. (2002) Description of New *Ensifer* strains from nodules and Proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Cassida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* En prensa.

Toro, N., Martínez-Abarca, F., Fernández-López, M. y Muñoz-Adelantado, E. (2003) Diversity of group II introns in the genome of *Sinorhizobium meliloti* strain 1021: splicing and mobility of RmInt1. *Molecular Genetic and Genomics.* En prensa.

Muñoz-Adelantado, E., San Filippo, J., Martínez-Abarca, F., García-Rodríguez, F.M., Lambowitz, A.M. y Toro, N. (2003). Mobility of the *Sinorhizobium meliloti* Group II Intron RmInt1 Occurs by Reverse Splicing into DNA, But Requires an Unknown Reverse Transcriptase Priming Mechanism. *J. Mol. Biol.* En prensa.

*A mis padres y hermano,
a la Yeya y el Tío
Salvador, que no están
aquí para compartir este
momento conmigo y
especialmente, a Eric*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.- LA SIMBIOSIS <i>Rhizobium</i>-LEGUMINOSA	3
1.1.- El proceso simbiótico	4
1.2.- Formación del nódulo	5
1.3.- Fijación Biológica de Nitrógeno	7
1.4.- Competitividad	8
2.- <i>Sinorhizobium meliloti</i>	9
2.1.- La cepa GR4 de <i>S. meliloti</i>	11
3.- SECUENCIAS DE INSERCIÓN	12
4.- INTRONES	14
4.1.- Intrones del grupo II	17
4.1.1.- El intrón del grupo II Rmlnt1 de <i>S. meliloti</i>	22
MATERIAL Y MÉTODOS	25
1.- MEDIOS DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS	27
1.1.- Medios para <i>Rhizobium</i> y <i>Agrobacterium</i>	27
1.2.- Medios para <i>E. coli</i> y <i>Pseudomonas</i>	28
1.3.- Medios de conservación	28
2.- ANTIBIÓTICOS	29
3.- ENSAYOS CON PLANTA	29
3.1.- Planta	29
3.2.- Esterilización de semillas	29
3.2.1.- <i>Medicago sativa</i> y <i>Medicago polymorpha</i>	29
3.2.2.- <i>Sesbania rostrata</i>	30
3.2.3.- <i>Leucaena gigante</i>	31
3.2.4.- <i>Vigna unguiculata</i>	31
3.3.- Solución nutritiva	31
3.3.1.- <i>Medicago sativa</i> y <i>Medicago polymorpha</i>	31
3.3.2.- <i>Sesbania rostrata</i> , <i>Leucaena gigante</i> y <i>Vigna unguiculata</i>	32
3.4.- Cultivo axénico de plantas	33
3.4.1.- <i>Medicago sativa</i> y <i>Medicago polymorpha</i>	33
3.4.2.- <i>Sesbania rostrata</i> , <i>Leucaena gigante</i> y <i>Vigna unguiculata</i>	34
3.5.- Inoculación de las plantas	34
3.6.- Medida de la competitividad por la ocupación de nódulos	34
3.7.- Aislamiento de nódulos	35
4.- EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL	36
4.1.- Obtención de lisados a partir de colonias	36
4.2.- Obtención de ADN total a partir de cultivo bacteriano en medio líquido	36
5.- AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO	38
5.1.- Minipreparación de plásmidos por lisis alcalina	38

5.2.- Preparación de ADN plasmídico por precipitación con sal de Magnesio.....	39
5.3.-“Wizard Minipreps”	40
6.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA, PCR.....	41
6.1.- PCR inversa.....	41
7.- ELECTROFORESIS DE ADN.....	42
7.1.- Electroforesis en gel de agarosa	42
7.2.- Revelado de geles y fotografía	42
7.3.- Estimación de los pesos moleculares de ADN por electroforesis en gel de agarosa	42
7.4.- Determinación de la concentración de ADN y oligonucleótidos.....	43
8.- MANIPULACIÓN ENZIMÁTICA DE ADN	43
8.1.- Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción.....	43
8.2.- Ligación de fragmentos de restricción.....	43
9.- EXTRACCIÓN DE ADN DE GEL DE AGAROSA	44
9.1.- Electroelución.....	44
9.2.- Purificación por columnas	45
10.- HIBRIDACIÓN ADN-ADN	45
10.1.- Transferencia de ADN a membranas de nylon.....	45
10.2.- Marcaje de sondas de ADN para hibridación	46
10.2.1.- Marcaje mediante la enzima <i>Klenow</i>	46
10.2.2.- Marcaje mediante PCR.....	46
10.3.- Hibridación ADN-ADN con sonda no radiactiva.....	47
11.- PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	48
12.- TRANSFERENCIA DE ADN.....	49
12.1.- Transformación.....	49
12.2.- Conjugación.....	49
12.3.- Electroporación.....	50
13.- SECUENCIACIÓN	51
13.1.- Obtención de cebadores y secuenciación automática	51
13.2.- Análisis informático de secuencias de ADN	51
14.- ENSAYOS DE <i>HOMING</i>	51
14.1.- Cuantificación de la eficiencia de <i>homing</i>	52
15.- EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.....	52
15.1.- Extracción de ARN de <i>Rhizobium</i>	52
15.2.- Desnaturalización con glicol y electroforesis en gel de agarosa.....	54
16.- ANÁLISIS DE <i>SPLICING</i> DE RmInt1 <i>IN VIVO</i>	54
17.- AISLAMIENTO DE PARTÍCULAS DE RIBONUCLEOPROTEÍNA.....	55
18.- <i>SDS PAGE</i>	57
18.1.- Extractos de proteínas.....	57
18.2.- Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes.....	57
18.3.- Detección de proteínas en geles de poliacrilamida	58

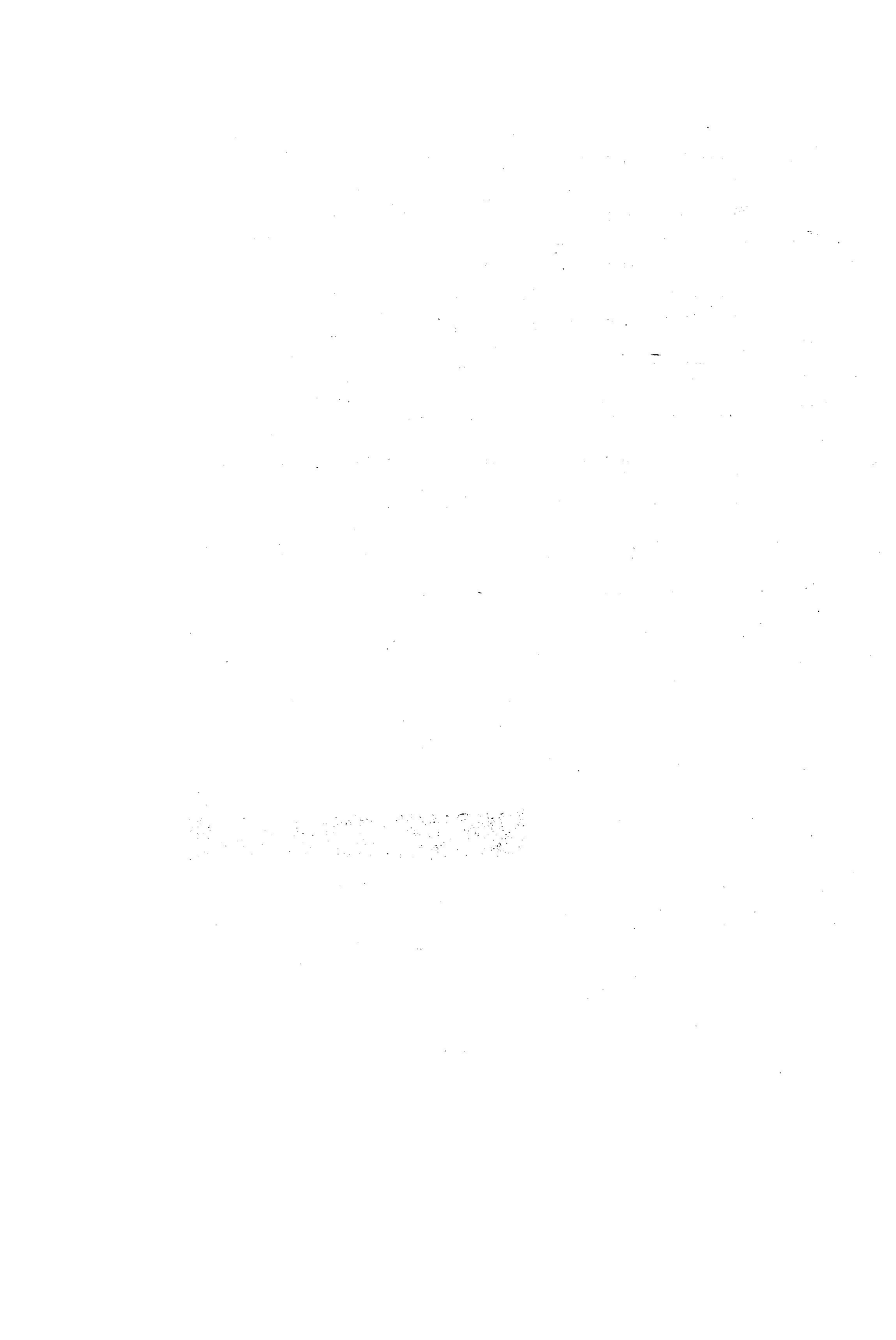
19.- ACTIVIDAD REVERSO TRANSCRIPTASA	59
19.1.- RT exógena	59
19.2.- RT endógena	59
20.- ACTIVIDAD ENDONUCLEASA Y <i>SPLICING</i> REVERSO. PREPARACIÓN DE SUSTRATOS	60
20.1.- Marcaje de cebadores en el extremo 5' y condiciones de PCR.....	60
20.2.- Marcaje de PCR internamente	61
20.3.- Marcaje de sustrato de ADN de cadena sencilla	61
20.4.- Purificación de sustratos	62
21.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD ADN ENDONUCLEASA Y <i>SPLICING</i> REVERSO	63
21.1.- Marcaje de marcador de peso molecular	64
21.2.- Escalera de secuenciación	64
21.3.- Tratamientos enzimáticos	65
22.- SÍNTESIS DE ADN MEDIADA POR CEBADOR	66
23.- PLEGAMIENTO DE MOLÉCULAS DE ARN	66
24.- CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES DERIVADOS DE RmInt1.....	67
OBJETO DEL TRABAJO.....	75
RESULTADOS	79
CAPÍTULO I.	
Diversidad de Intrones del Grupo II en el Genoma de la Cepa 1021 de <i>Sinorhizobium</i>	
<i>meliloti</i>: <i>Splicing</i> y Movilidad	81
INTRODUCCIÓN	83
MATERIAL Y MÉTODOS.....	87
1.- CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	87
2.- OLIGONUCLEÓTIDOS Y CONDICIONES DE PCR.....	87
3.- ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE ARN Y DE ADN	88
4.- ENSAYOS DE <i>HOMING</i>	88
5.- ANÁLISIS DE <i>SPLICING</i> DE RmInt1 <i>IN VIVO</i>	88
6.- HIBRIDACIÓN DE ADN Y <i>FINGERPRINT</i>	89
RESULTADOS	91
1.- PRESENCIA Y DISTRIBUCIÓN DEL INTRÓN DEL GRUPO II RmInt1 EN EL GENOMA DE LA CEPA DE <i>S. meliloti</i> 1021.....	91
2.- CARACTERIZACIÓN DE LAS TRES COPIAS DEL INTRÓN RmInt1 EN EL GENOMA DE <i>S. meliloti</i> 1021	91
3.- EL INTRÓN DEL GRUPO II RmInt1 CARECE DE MOVILIDAD EN EL FONDO GENÉTICO DE LA CEPA 1021	94
4.- <i>SPLICING</i> DE RmInt1 EN LA CEPA 1021 DE <i>S. meliloti</i>	96
5.- OTROS INTRONES PRESENTES EN EL GENOMA DE LA CEPA 1021	97
6.- CARACTERIZACIÓN Y ESTRUCTURA DE ARN DE LOS INTRONES DEL GRUPO II	

SMb21167/SMb21477 Y SMa1875	99
7.- DISTRIBUCIÓN DE LOS INTRONES DEL GRUPO II SMb21167/SMb21477 Y SMa1875	
EN <i>S. meliloti</i>	102
DISCUSIÓN.....	105
CAPÍTULO II.	
Transposición Ectópica del Intrón del Grupo II RmInt1 en Poblaciones Bacterianas Naturales..	109
INTRODUCCIÓN.....	111
MATERIAL Y MÉTODOS	113
1.- AISLAMIENTO DE CEPAS DE <i>Sinorhizobium meliloti</i>	113
1.1.- Preparación del campo de cultivo y siembra	113
1.2.- Aislamiento de nódulos	113
2.- OLIGONUCLEÓTIDOS	114
3.- CONDICIONES DE PCR.....	115
4.- PCR INVERSA.....	115
5.- DINÁMICA DE LOS ELEMENTOS ISRm2011-2, ISRm2011-2::RmInt1 Y RmInt1 EN LA	
POBLACIÓN TIPO-GR4	117
RESULTADOS	119
1.- IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS TIPO-GR4 DE POBLACIONES NATURALES DE	
CAMPO DE <i>Sinorhizobium meliloti</i>	119
2.- VARIACIÓN GENÉTICA DENTRO DE LA POBLACIÓN TIPO-GR4	122
3.- COMPORTAMIENTO DINÁMICO DE LOS ELEMENTOS ISRm2011-2,	
ISRm2011-2::RmInt1 Y RmInt1 EN LA POBLACIÓN TIPO-GR4	124
4.- TRANSPOSICIÓN ECTÓPICA DEL INTRÓN DEL GRUPO II RmInt1 EN LA	
POBLACIÓN NATURAL DE <i>S. meliloti</i> TIPO-GR4.....	125
DISCUSIÓN.....	127
CAPÍTULO III.	
Caracterización de un Intrón Tipo-RmInt1 en la Especie <i>Sinorhizobium adhaerens</i>.	
Descripción de una Nueva Secuencia de Inserción, ISRm10-3, Perteneciente a la	
Familia IS630-Tc1	131
INTRODUCCIÓN.....	133
MATERIAL Y MÉTODOS	135
1.- AISLAMIENTO DE LA CEPA 5D19.....	135
2.- OLIGONUCLEÓTIDOS	135
3.- CARACTERIZACIÓN DEL SITIO ECTÓPICO MEDIANTE PCR INVERSA	136
4.- ESTUDIOS DE INOCULACIÓN Y RANGO DE HOSPEDADOR DE LA CEPA 5D19.....	138
RESULTADOS	139
1.- EL AISLADO NATURAL DE CAMPO 5D19.....	139
2.- RmInt1 EN EL AISLADO 5D19.....	140
3.- EL SITIO ECTÓPICO DE RmInt1: UNA NUEVA SECUENCIA DE INSERCIÓN	143
4.- LA CEPA 5D19 OCUPA NÓDULOS DE ALFALFA AYUDADA POR CEPAS	

DE <i>S. meliloti</i>	146
DISCUSIÓN	149
CAPÍTULO IV.	
Estudios de Movimiento del Intrón del Grupo II RmInt1 en Huéspedes Heterólogos.....	153
INTRODUCCIÓN	155
MATERIAL Y MÉTODOS.....	157
1.- CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS	157
2.- OLIGONUCLEÓTIDOS	158
3.- PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y MÉTODOS DE TRANSFERENCIA DE ADN	159
4.- OBTENCIÓN DE ADN.....	159
5.- HIBRIDACIÓN ADN-ADN	160
6.- CUANTIFICACIÓN DE LA EFICIENCIA DE <i>HOMING</i>	160
7.- AISLAMIENTO Y SECUENCIACIÓN DEL PLÁSMIDO PRODUCTO DE <i>HOMING</i>	160
RESULTADOS	163
1.- <i>HOMING</i> DE RmInt1 EN DISTINTOS FONDOS GENÉTICOS.....	163
DISCUSIÓN	169
CAPÍTULO V.	
El Movimiento del Intrón del Grupo II de <i>Sinorhizobium meliloti</i> RmInt1 Ocurre por <i>Splicing</i> Reverso en ADN, pero Requiere un Mecanismo Deconocido para Generar un Cebador para la Transcripción Reversa.....	171
INTRODUCCIÓN	173
MATERIAL Y MÉTODOS.....	177
1.- CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	177
2.- OLIGONUCLEÓTIDOS	177
3.- CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES DERIVADOS DE RmInt1.....	178
4.- ANÁLISIS DE <i>SPLICING IN VIVO</i> Y DE <i>HOMING</i>	179
5.- AISLAMIENTO DE PARTÍCULAS DE RIBONUCLEO-PROTEÍNA.....	179
6.- ACTIVIDAD REVERSO TRANSCRIPTASA	180
6.1.- RT exógena.....	180
6.2.- RT endógena.....	180
7.- ACTIVIDAD ENDONUCLEASA Y <i>SPLICING</i> REVERSO. PREPARACIÓN DE SUSTRATOS	181
7.1.- Marcaje de cebadores en el extremo 5' y condiciones de PCR.....	181
7.2.- Marcaje de PCR internamente	181
7.3.- Marcaje de sustrato de ADN de cadena sencilla	182
8.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD ADN ENDONUCLEASA Y <i>SPLICING</i> REVERSO	182
9.- SÍNTESIS DE ADN MEDIADA POR CEBADOR	182
RESULTADOS	183
1.- LA MOVILIDAD DE RmInt1 REQUIERE DEL ARN DEL INTRÓN ESCINDIDO Y DE	

LA PROTEÍNA CODIFICADA POR EL MISMO	183
2.- LA PROTEÍNA CODIFICADA POR RmInt1 PRESENTA ACTIVIDAD RT CON EL SUSTRATO poli(rA)/oligo(dT) ₁₈	186
3.- ACTIVIDAD RT ENDÓGENA DE LAS PARTÍCULAS DE RIBONUCLEOPROTEÍNA DERIVADAS DE RmInt1	187
4.- INICIACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ADN MEDIADA POR CEBADOR POR LA ACTIVIDAD RT DEL INTRÓN RmInt1.....	189
5.- CORTE DE LA CADENA SENTIDO POR RmInt1 SOBRE ADN DE CADENA DOBLE	192
6.- CORTE DE ADN DE CADENA SIMPLE POR RmInt1.....	194
DISCUSIÓN.....	199
CONCLUSIONES	205
ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS	209
BIBLIOGRAFÍA	213
AGRADECIMIENTOS.....	237
ANEXO.....	241

INTRODUCCIÓN



1.- LA SIMBIOSIS *Rhizobium*-LEGUMINOSA

Las leguminosas constituyen una de las mayores familias de plantas, comprendiendo cerca de 19.000 especies descritas (Allen y Allen, 1981). Estas plantas se encuentran ampliamente distribuidas geográficamente y presentan gran interés agro-económico por tratarse de una importante fuente de alimentación animal y humana. Uno de los factores limitantes del crecimiento vegetal es el nitrógeno. Su forma molecular N_2 constituye el 78% de los gases que integran la atmósfera. A pesar de su abundancia, no puede ser incorporado a la vida vegetal debido a su carácter inerte cuando se encuentra en forma molecular. Únicamente los microorganismos diazotrofos pueden utilizar el N_2 , transformándolo en NH_4^+ mediante el proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN). Este proceso genera las dos terceras partes del nitrógeno fijado en la atmósfera, siendo los procesos espontáneos o industriales responsables de la fijación del nitrógeno restante.

Los microorganismos diazotrofos se encuentran ampliamente distribuidos filogenéticamente (Young, 1992) y pueden dividirse en dos grupos, los que son capaces de realizar la fijación biológica de nitrógeno en vida libre, y los que requieren para ello establecer una relación simbiótica, fundamentalmente con plantas leguminosas. En este segundo caso, podemos destacar un conjunto de microorganismos de suelo, pertenecientes a 5 géneros bacterianos: *Sinorhizobium* y *Rhizobium*, que pertenecen a la familia *Rhizobiaceae*; *Bradyrhizobium*, (familia *Bradyrhizobiaceae*); *Mesorhizobium*, de la familia *Phyllobacteriaceae* y *Azorhizobium*, (familia *Hyphomicrobiaceae*), todos ellos incluidos en el orden Rhizobiales (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed., 2001).

La importancia de esta relación simbiótica entre rizobios y leguminosas se basa en la gran eficiencia de la fijación biológica de nitrógeno, del orden de 10 a 20 veces mayor que en el caso de fijadores de vida libre, contribuyendo en gran medida al nitrógeno fijado de forma estable en condiciones agronómicas (Vance, 1998). De igual modo, la amplia dispersión geográfica de estas plantas y su considerable empleo en alimentación, así como la protección de los cultivos y del medio ambiente al evitar el uso indiscriminado de fertilizantes industriales, hacen de la relación simbiótica un tema de interés creciente en los últimos años.

La investigación en profundidad de cada uno de los dos componentes implicados en la simbiosis, tanto de la planta leguminosa como del microorganismo, puede conducir a una mejora en la aplicación agronómica y beneficio económico y medio ambiental.

1.1.- El proceso simbiótico

El proceso simbiótico comienza con un intercambio de señales bioquímicas entre la planta y las bacterias. Las raíces de la planta producen una serie de compuestos orgánicos quimioatrayentes (flavonoides, betaínas, etc.) (Fisher y Long, 1992; Schlaman *et al.*, 1992) que estimulan el crecimiento de los rizobios del suelo e inducen en éstos la activación transcripcional de un conjunto de genes específicos para la nodulación (genes *nod*, *nol* y *noe*). Estos genes se encuentran principalmente en el plásmido simbiótico (pSym) de los rizobios y sus productos proteicos contribuyen a la biosíntesis y secreción de lipo-quitoo-oligosacáridos (factores Nod) que inducen una serie de respuestas morfogénicas en la planta, a nivel de la epidermis, el córtex y el periciclo de la raíz. En el proceso de regulación de los genes *nod* intervienen numerosos factores medioambientales y génicos, entre los que se encuentran implicados las proteínas NodD y SyrM (Kondorosi *et al.*, 1991).

Tras la quimiotaxis y la inducción de los genes *nod*, las bacterias se adsorben a los pelos radicales. En la adhesión parecen estar implicados tanto componentes superficiales de los rizobios (polisacáridos extracelulares, lipopolisacáridos, ricadhesina, etc.) como compuestos de la planta (lectinas) (Díaz *et al.*, 1996; Dazzo y Truchet, 1983; Kijne *et al.*, 1997).

El proceso de infección (Figura 1) se puede resumir en varias etapas (Hadri *et al.*, 1998):

- 1) deformación y curvatura del pelo radical a nivel de epidermis, córtex y periciclo, inducidos por los factores Nod
- 2) formación del cordón de infección, llevado a cabo mediante una hidrólisis parcial y localizada de la pared celular e invaginación de la membrana plasmática de la célula vegetal (van Spronsen *et al.*, 1994; Kijne, 1992)
- 3) infección a través del cordón de infección, donde las bacterias se multiplican activamente rodeadas de exopolisacáridos (Leigh y Walker, 1994; Reuhs *et al.*, 1995)

4) liberación de las bacterias rodeadas por membrana peribacteroidal al citoplasma de la célula vegetal, cuando el cordón de infección llega al primordio nodular y se ramifica

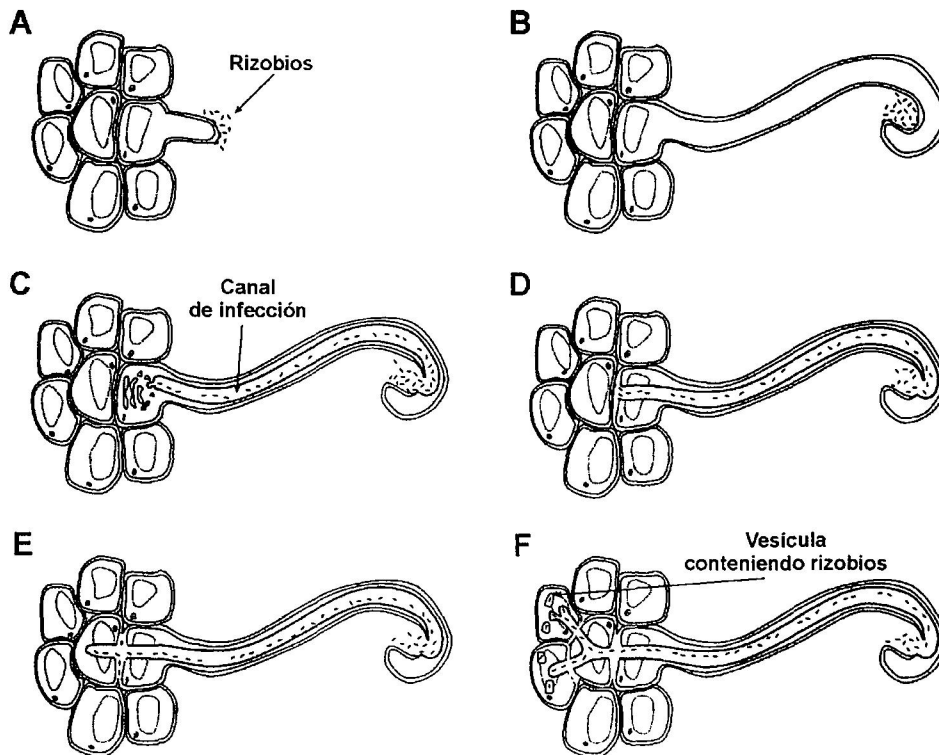


Figura 1. El proceso de infección. A.- Los rizobios se adhieren al pelo radical. B.- En respuesta a los factores Nod producidos por las bacterias, el pelo radical comienza a curvarse. C.- La degradación de la pared celular del pelo radical permite la infección a través del canal de infección. D.- El canal de infección alcanza el final de la célula y su membrana se fusiona con la membrana plasmática. E.- Los rizobios se liberan al apoplasto y penetran en la membrana plasmática de la célula subepidermal, permitiendo el inicio de un nuevo canal de infección. F.- El canal de infección se extiende y ramifica hasta alcanzar el primordio nodular, donde las vesículas conteniendo las bacterias se liberan al citoplasma. Figura basada en Taiz y Zeiger (1991).

1.2.- Formación del nódulo

Se ha descrito la existencia de dos tipos de nódulos en plantas leguminosas: nódulos determinados (p.ej.: en soja y judía) e indeterminados (p.ej.: en guisante y alfalfa) (Figura 2). Los nódulos indeterminados se originan por la división celular del córtex interno y presentan un meristemo persistente en el ápice. Debido a la continua actividad

del meristemo, las células del nódulo forman un gradiente de desarrollo desde la zona distal meristemática a la zona proximal del sitio de unión a la raíz (Vasse *et al.*, 1990; Hadri *et al.*, 1998; Franssen *et al.*, 1992). Los nódulos determinados se originan por la división celular del córtex externo y carece de un meristemo permanente, pues su crecimiento cesa en una etapa temprana del desarrollo. Como resultado, las células del nódulo determinado se encuentran en una etapa de desarrollo bastante similar.

Los tejidos periféricos (parénquima nodular) funcionan como una barrera de oxígeno, creando un compartimiento con baja tensión de O₂ necesario para la estabilidad del complejo enzimático de la nitrogenasa, que lleva a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno.

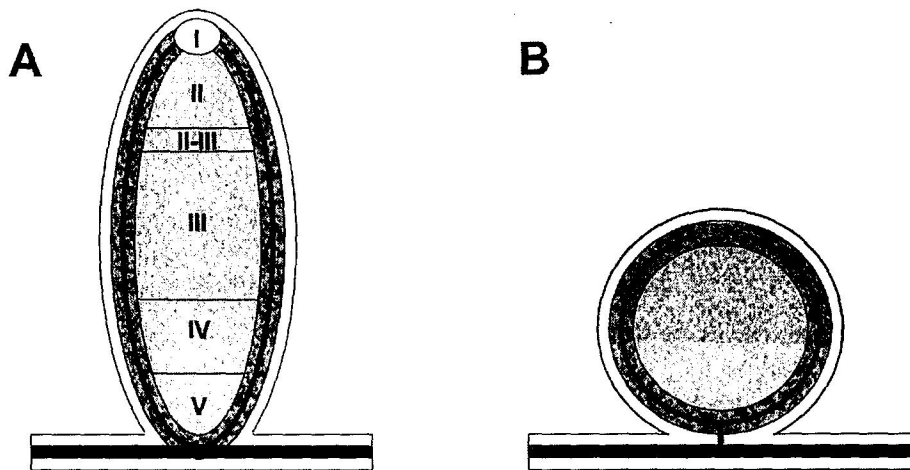
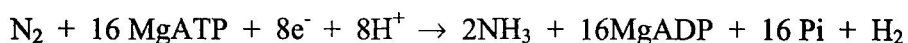


Figura 2. Representación esquemática de nódulos de plantas leguminosas. A.- Nódulo indeterminado. Los nódulos indeterminados presentan siete secciones centrales (Vasse *et al.*, 1990; Timmers *et al.*, 2000): i) zona I, donde el meristemo apical asegura el crecimiento continuo del nódulo a lo largo de varias semanas; ii) zona II, de infección o prefijación, donde se liberan las bacterias desde el canal de infección; iii) interzona II-III, zona de acumulación de almidón en plastidios; iv) zona III, subdividida en región distal, en la que los bacteroides rodeados de membrana peribacteroidal fijan nitrógeno y región proximal, donde no tiene lugar este proceso; v) zona IV, también llamada de senescencia, en la que se produce la degeneración de ambos simbiontes y vi) zona V, conteniendo rizobios que poseen características ultraestructurales de bacterias de vida libre, denominados rizoboides. La liberación de estos rizobios en la zona V se produce de manera pasiva desde el canal de infección. B.- Nódulo determinado. Este tipo de nódulo carece de meristemo apical y sus células no se han diferenciado en distintas zonas. Figura basada en Pawlowsky *et al.* (1996), actualizada según Timmers *et al.* (2000).

1.3.- Fijación Biológica de Nitrógeno

El proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN) llevado a cabo por las bacterias simbiotes tiene lugar en el interior de los nódulos de raíces de las plantas leguminosas. La enzima responsable de la FBN se denomina nitrogenasa. Se trata en realidad de un complejo enzimático que puede ser dividido en dos componentes, proteína MoFe y proteína Fe, ninguno de los cuales tiene actividad catalítica por separado. Ambos componentes son sensibles al oxígeno, que inactiva de forma irreversible esta enzima. En el interior del nódulo existe baja tensión de O₂, por lo que este microambiente de anaerobiosis es el óptimo para que la FBN tenga lugar. La cantidad de oxígeno libre se reduce por la alta tasa de respiración de los simbiotes y por la presencia de una proteína de unión a oxígeno, leghemoglobina (Appleby, 1984; Quispel, 1983), que facilita la difusión de oxígeno a través de la fina pared que rodea los bacteroides. Esta proteína se localiza en alta concentración en el citoplasma de las células infectadas y da origen al color rosado de los nódulos. La porción de globina de la leghemoglobina es sintetizada por la planta hospedadora en respuesta a la infección bacteriana (Marschner, 1986) y la parte hemo es producida por la bacteria simbiote (Appleby, 1984).

El producto final del proceso de fijación de nitrógeno es amonio, NH₃, que se incorpora en compuestos orgánicos tales como glutamato o glutamina y puede ser utilizado de esta manera por la planta hospedadora. La reacción global de este proceso catalizado por la nitrogenasa es la siguiente:



La reducción de N₂ por la nitrogenasa requiere un gran aporte de ATP. Aunque la reacción global es exergónica, la producción de amonio se encuentra limitada por la baja tasa de renovación del complejo enzimático de la nitrogenasa (Ludwig y de Vries, 1986). El nitrato es generalmente la principal forma de nitrógeno asimilable por las plantas, sin embargo, algunas de ellas pueden utilizar directamente el amonio bajo ciertas condiciones, como ocurre cuando crecen en suelos ácidos, en los que la nitrificación llevada a cabo por el microorganismo se encuentra inhibida (Rice y Pancholy, 1974).

1.4.- Competitividad

Competitividad se define como la capacidad que presenta una cepa de *Rhizobium* para formar nódulos con una determinada planta leguminosa en presencia de otras estirpes de *Rhizobium* del mismo grupo de inoculación. Esta capacidad es dependiente de la facultad para persistir en el suelo, multiplicarse en la rizosfera y colonizar e infectar la raíz. Las características del suelo y del medio ambiente que rodean la bacteria influyen en su capacidad de persistencia. La capacidad de colonización e infección se ven influidos por características tanto bacterianas como de la planta hospedadora.

Los factores medioambientales que afectan a la competitividad son numerosos y entre ellos podemos destacar pH, niveles de Ca^{2+} , temperatura, humedad del suelo y salinidad, nutrientes y tipo de suelo. La presencia de la planta hospedadora puede influir en el tipo y el tamaño de las poblaciones de *Rhizobium* que habitan en suelo, debido a la especificidad de reconocimiento de las señales químicas, lo que determina el denominado rango de hospedador. Se ha descrito la presencia en los exudados radicales de la planta hospedadora de *S. meliloti* (*Medicago sativa* L.) de nutrientes tales como la prolina y otros compuestos cuya degradación liberan prolina (betainas y estaquidrina) que podrían ser una fuente de energía importante durante las primeras etapas de la simbiosis (Kohl *et al.*, 1994, 1991; Zhu *et al.*, 1992; Fougère *et al.*, 1991). La enzima prolina deshidrogenasa (*putA*) es una enzima bifuncional que cataliza la oxidación de prolina a glutamato. Se ha caracterizado un mutante de *S. meliloti* afectado en el gen que codifica la enzima *putA*. Este mutante se halla afectado en su capacidad competitiva como consecuencia de un defecto en la colonización de la raíz de la planta hospedadora (Jiménez-Zurdo *et al.*, 1995, 1997; van Dillewijn, 2000; van Dillewijn *et al.*, 2001). Por lo tanto, la competitividad de los rizobios también puede verse afectada por los nutrientes presentes en los exudados radicales de la planta.

La presencia en la rizosfera de otros microorganismos puede afectar a las especies nodulantes de rizobios. Existen bacterias predadoras que pueden reducir la población de *Rhizobium* en suelo, así como protozoos o parásitos. Sin embargo, también es posible que los rizobios se beneficien de asociaciones con otros microorganismos, como es el caso de asociaciones con micorrizas.

2.- *Sinorhizobium meliloti*

Sinorhizobium meliloti es una bacteria gram-negativa perteneciente a la familia *Rhizobiaceae* dentro del orden Rhizobiales de las α -Proteobacterias. *S. meliloti* se encuentra en el suelo y la rizosfera. Esta bacteria induce la formación de nódulos indeterminados en raíces de un conjunto de especies de *Medicago*, incluyendo *M. sativa* (alfalfa), dentro de los cuales fija nitrógeno atmosférico. Esta asociación simbiótica es considerada muy importante para la agricultura. La formación y colonización de nódulos de raíces de alfalfa por *S. meliloti* se produce por una serie de complejas interacciones controladas por el intercambio de señales moleculares entre la bacteria y la planta hospedadora, y requiere la regulación espacial y temporal de genes específicos de los dos organismos simbióticos (Denarié *et al.*, 1992, 1993; Long, 1996; Fisher y Long, 1992).

S. meliloti está siendo estudiada por investigadores de todo el mundo debido su rápido crecimiento y su facilidad para ser empleada en técnicas moleculares y genéticas en laboratorio. El interés en *S. meliloti* se ha visto fomentado por la elección de *S. meliloti*-*M. truncatula* como el sistema modelo para el estudio de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

La secuenciación del genoma de la cepa 1021 de *S. meliloti* ha sido recientemente completada (Barloy-Hubler *et al.*, 2000a, 2000b; Barnett *et al.*, 2001; Capela *et al.*, 1999, 2001; Finan *et al.*, 2001; Galibert *et al.*, 2001). Consiste en tres mega-replicones: un cromosoma de 3.654 Kb y dos megaplásmidos, pSymA (1.354 Kb) y pSymB (1.683 Kb) (Burkardt *et al.*, 1987; Sobral *et al.*, 1991). Los genes implicados en la simbiosis se localizan en los tres replicones pero se encuentran más frecuentemente en los megaplásmidos. Los genes implicados en la nodulación y fijación de nitrógeno se localizan en el plásmido pSymA (Barnett *et al.*, 2001; Galibert *et al.*, 2001; Barloy-Hubler *et al.*, 2000a), mientras que las otras funciones necesarias para la simbiosis se encuentran en el plásmido pSymB (Finan *et al.*, 2001). Estos dos elementos génicos poseen características propias de cromosoma y de plásmido: son 3 órdenes de magnitud más grandes que cualquier vector de clonaje y presentan copias de genes asociados a funciones metabólicas. En el plásmido pSymB se ha localizado una región génica que codifica el ARNt para la arginina, esencial para el crecimiento bacteriano, por lo que este plásmido simbiótico puede ser considerado como un segundo cromosoma (Finan *et*

al., 2001). Sin embargo, los megaplásmidos pueden ser curados sin afectar en exceso el crecimiento y la reproducción celular bacteriana (Hynes *et al.*, 1989). La cepa Rm2011 puede ser curada del plásmido pSymA sin verse afectada en el crecimiento, si el medio de cultivo bacteriano es un medio rico o medio mínimo con succinato, pues esta cepa es deficiente en la utilización de determinadas fuentes de carbono (Oresnik *et al.*, 2000).

El análisis de secuenciación nucleotídica llevado a cabo sobre los tres replicones del genoma de la cepa 1021 de *S. meliloti* ha permitido conocer en detalle la existencia y localización de los genes implicados en simbiosis y en otras funciones metabólicas importantes.

El análisis del cromosoma de la cepa 1021 (3.654.135 pares de bases) revela un contenido total en G+C del 62,7%. Las regiones codificantes (incluyendo proteínas y ARN) constituyen el 85,8%. Se han descrito 3.341 genes codificantes de proteína. La plasticidad del genoma resultó ser menor de lo esperado, debido a que las funciones relacionadas con transposones y secuencias de inserción representa únicamente el 2,2% del total del cromosoma (Capela *et al.*, 2001). Entre las 16 diferentes secuencias de inserción localizadas (aportando un número total de 41 copias completas de estos elementos, 7 copias parciales y 2 inactivadas por inserción de otros elementos) se encuentra *ISRm2011-2*, existiendo 6 copias completas en el cromosoma. Además de los genes implicados en el metabolismo de proteínas y ácidos nucleicos y en las rutas universales de biosíntesis, en el cromosoma se han descrito otros genes necesarios para la movilidad y procesos de quimiotaxis y para respuesta ante el estrés.

La secuenciación del plásmido pSymA (1.354.226 pares de bases) ha revelado la existencia de 1.293 posibles genes, con una capacidad de codificación del 83,2% (Barnett *et al.*, 2001; Galibert *et al.*, 2001). El contenido en G+C de este plásmido es del 60,4%. Muchos de los genes localizados en pSymA son necesarios para la nodulación y fijación de nitrógeno, y este estudio ha puesto de manifiesto la presencia de más genes implicados en la simbiosis, utilización de diversas fuente de carbono y nitrógeno y respuesta a estrés medioambiental (Barnett *et al.*, 2001). Se ha determinado la existencia de 21 copias de secuencias de inserción completas, 5 incompletas y 2 inactivadas (correspondiendo a 12 elementos distintos) distribuidas a lo largo de todo el replicón. Entre ellas, aparecen 4 copias de *ISRm2011-2*, una de las cuales se encuentra invadida por el intrón del grupo II RmInt1.

El análisis del plásmido pSymB ha demostrado que posee una alta densidad génica, similar a cromosomas previamente secuenciados (Finan *et al.*, 2001), con un contenido

medio en G+C del 62,4%, similar al del cromosoma de *S. meliloti* (1 ORF/1,1 Kb). Se estima que el 90% de la secuencia nucleotídica es codificante de proteínas, constituyendo 1.570 marcos abiertos de lectura (ORFs). Es notable la ausencia de genes implicados directamente en la nodulación y fijación simbiótica de nitrógeno, pero la presencia de genes relacionados con el proceso simbiótico en el plásmido pSymB conduce a pensar que éste juega un papel importante en la adaptación a la simbiosis (Finan *et al.*, 2001). Se han localizado un pequeño número de secuencias de inserción (10 copias completas, 2 incompletas y 1 inactivada, correspondiendo a 9 elementos distintos). Existen dos copias de la secuencia *ISRm2011-2*, una de ellas asociada a una de las dos copias de *RmInt1*. La otra copia de *RmInt1* se encuentra insertada en la secuencia de inserción *ISRm10-1*.

Una vez completada la secuenciación del genoma de la cepa 1021 de *S. meliloti* queda por determinar la mayor parte de las funciones biológicas que codifican los posibles genes caracterizados. La identificación de estas funciones nos permitirá un mayor conocimiento sobre la interacción de *S. meliloti* con plantas y cómo puede esta bacteria vivir y sobrevivir en el medioambiente del suelo.

2.1.- La cepa GR4 de *S. meliloti*

La cepa GR4 de *S. meliloti* presenta en su genoma, además del cromosoma y los dos megaplásmidos, dos plásmidos crípticos, pRmeGR4a (115 MDa) y pRmeGR4b (140 MDa), no necesarios para la simbiosis, pero que podrían mejorar el proceso simbiótico (Toro y Olivares, 1986). Como ejemplo de la dispensabilidad de estos plásmidos, existen tres cepas curadas: GRM10, que carece del plásmido pRmeGR4a, GRM6, curada del plásmido pRmeGR4b y GRM8, curada de ambos plásmidos. Diferentes estudios han demostrado que la habilidad competitiva para la nodulación de la cepa GR4 radica en una región de ADN denominada *nfe*, localizada en el plásmido pRmeGR4b (Sanjuan y Olivares, 1989; Toro y Olivares, 1986; Soto *et al.*, 1993). En este plásmido se han identificado y caracterizado los genes *dapA* y *dapB*, que codifican las enzimas dihidropicolinato sintasa y dihidropicolinato reductasa, respectivamente (García-Rodríguez, 1998; García-Rodríguez *et al.*, 2000). Estos dos genes se encuentran como copia única en el genoma de GR4, y siempre asociados a pRmeGR4b, que parece presentar una distribución clonal asociada a GR4. Por ello, la determinación de la

presencia de estos genes en una cepa de *S. meliloti* permite su clasificación como cepa tipo-GR4 (Villadas *et al.*, 1995; Muñoz *et al.*, 2001).

Diversos estudios de secuenciación realizados sobre el genoma de la cepa GR4 de *S. meliloti* han puesto de manifiesto la presencia de un gran número de elementos génicos móviles. La existencia de estos elementos móviles confiere la característica de plasticidad genómica, relacionada con la evolución de los genomas bacterianos.

Entre los elementos móviles se encuentran las secuencias de inserción. En GR4 se han descrito numerosas de ellas, entre las que se hallan: *ISRm3* (Soto *et al.*, 1992a), *ISRm4* (Soto *et al.*, 1992b), *ISRm4-1* e *ISRm9* (Zekrí *et al.*, 1998), *ISRm6* (Zekrí y Toro, 1996) e *ISRm2011-2* (Selbitschka *et al.*, 1995a). La secuencia de inserción más abundante en la cepa GR4 de *S. meliloti* y, en general en esta especie bacteriana, es *ISRm2011-2*. Varios autores han descrito la facultad de emplear las secuencias de inserción como herramientas para realizar estudios ecológicos sobre poblaciones bacterianas (Selbitschka *et al.*, 1995b). Así pues, el elemento génico *ISRm2011-2* se presenta como un buen marcador para analizar la variabilidad genómica de poblaciones bacterianas de suelo de *S. meliloti* tipo-GR4.

Junto a las secuencias de inserción, un nuevo tipo de elementos móviles está cobrando importancia: los intrones bacterianos. *RmInt1* es el primer intrón descrito en la familia *Rhizobiaceae*, en la cepa GR4 de *S. meliloti* (Martínez-Abarca *et al.*, 1998), perteneciente al grupo II de intrones bacterianos, más concretamente a la clase D (Martínez-Abarca y Toro, 2000a; Zimmerly *et al.*, 2001). Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre su abundancia y distribución, tanto en cepas de *S. meliloti* como en cepas de otros microorganismos del orden Rhizobiales. *RmInt1* es muy abundante en cepas de *S. meliloti* y se encuentra en el genoma desde 1 a 9 copias. Hasta la fecha, *RmInt1* es el único intrón del grupo II presente en alto número de copias en un genoma bacteriano, lo que le convierte en una herramienta muy útil para ser empleado como marcador genético en estudios ecológicos para analizar diversidad genómica en poblaciones bacterianas de *S. meliloti*.

3.- SECUENCIAS DE INSERCIÓN

Las secuencias de inserción (ISs) son consideradas responsables directa o indirectamente de una gran parte de las variaciones genéticas entre cepas y especies,

debido a su capacidad de movilidad en el genoma y entre genomas. Una implicación evolutiva de las secuencias de inserción deriva de la actividad mutagénica de estos elementos sobre los genes en los que se insertan. De igual modo, las ISs pueden estar implicadas en procesos de represión, delección y recombinación génica. Las secuencias de inserción juegan también un papel importante en la evolución del genoma (incluyendo plásmidos y transposones) ya que promueven grandes reorganizaciones génicas que contribuyen a la plasticidad genómica de los microorganismos (Galas y Chandler, 1989).

Dentro de las bacterias gram-negativas, la mayor parte de las secuencias de inserción han sido encontradas en bacterias entéricas (Galas y Chandler, 1989; Iida *et al.*, 1983), *Agrobacterium tumefaciens* (Deng *et al.*, 1995; Vanderleyden *et al.*, 1986), *Xanthomonas campestris* (Kearney y Staskawicz, 1990), *Rhizobium* (Dusha *et al.*, 1987; Ruvkun *et al.*, 1982; Selbitschka *et al.*, 1995a; Simon *et al.*, 1991; Soto *et al.*, 1992a, 1992b; Zekrí *et al.*, 1996, 1998) y *Pseudomonas* (Gaffney y Lessie, 1987; Yamada *et al.*, 1986).

Se han descrito más de 500 secuencias de inserción aisladas de más de 73 géneros de 159 especies bacterianas. Este gran número de ISs han sido agrupadas en 17 familias, de acuerdo a diversos criterios, tales como similitud en reorganización génica (presencia de 1 o 2 marcos abiertos de lectura), dominios o motivos de las Transposasas (Tpasas) comunes, analogía en las terminaciones repetidas invertidas y generación de la duplicación directa de la diana (Mahillon y Chandler, 1998).

Las secuencias de inserción suelen tener un tamaño reducido (800-2.500 pares de bases), que generalmente codifican las funciones necesarias para su propio proceso de transposición. Esto incluye factores en *cis*, en secuencias de ADN activas en recombinación, que definen las terminaciones de las ISs, y la proteína requerida para el movimiento. Esta proteína se denomina transposasa (Tpassa) y generalmente está codificada por uno o dos marcos abiertos de lectura (ORF) que ocupan casi la totalidad de la secuencia. La mayor parte de las secuencias de inserción descritas presentan repeticiones terminales invertidas de corta longitud. En el proceso de inserción, las ISs pueden generar secuencias repetidas directas de la secuencia diana que flanquea la IS, siendo estas repeticiones también de reducido tamaño (Galas y Chandler, 1989).

Las Tpasas constituidas por dos marcos abiertos de lectura (ORFs) presentan un mecanismo de regulación translacional, implicando un cambio de lectura entre los dos ORFs consecutivos (Chandler y Fayet, 1993). En este proceso, el ribosoma sufre un

deslizamiento en fase -1 hacia el extremo 5' y comienza una fase de lectura alternativa. Este deslizamiento está estimulado por estructuras del ARNm que tienden a impedir la progresión del ribosoma. La transposición se encuentra frecuentemente modulada por factores de la célula hospedadora, entre los que se incluyen las ADN chaperonas. Estas proteínas tipo-histonas juegan un papel importante en la arquitectura tridimensional de la Tpasas y pueden intervenir regulando la expresión de éstas. Las Tpasas presentan un motivo DDE, consistente en una tríada catalítica cuyo papel es probablemente coordinar los cationes metálicos divalentes (especialmente Mg^{2+}) implicados en los ataques nucleofílicos durante el curso de la transposición. Este motivo se encuentra altamente conservado en integrasas retrovirales y en la mayoría de las secuencias de inserción (Kulkosky *et al.*, 1992).

La distribución y número de ISs dentro y entre especies bacterianas han sido investigados a menudo como parte inicial de la caracterización de un nuevo elemento, generalmente realizado a través de hibridación de ADN. La transferencia horizontal de secuencias de inserción en la naturaleza no es un hecho extraño dado el número y diversidad de elementos extracromosómicos autónomos, tales como plásmidos, que pueden servir como vectores, en particular los plásmidos de amplio rango de hospedador. El estudio de la distribución y número de las secuencias de inserción en el genoma es de gran importancia para comprender la dinámica poblacional de estos elementos.

4.- INTRONES

Los intrones son elementos génicos que generalmente se localizan interrumpiendo secuencias de ADN codificantes, denominadas exones. Los intrones son eliminados del precursor de ARN mediante un proceso de maduración denominado ARN *splicing*. Existen varias clases de intrones, presentando diferencias en cuanto a su secuencia nucleotídica y estructura secundaria, así como en los mecanismos de *splicing* y movimiento. Se han descrito tres diferentes rutas de *splicing* (Figura 3), caracterizadas por: i) un intermediario en forma de lazo (Figura 3A); ii) inicio del proceso vía un residuo de guanosina exógeno (Figura 3B) o iii) requerimiento de la presencia de las enzimas endonucleasa y ligasa (Figura 3C).

Los intrones del grupo II, los intrones degenerados del grupo III y los intrones espliceosomales nucleares presentan una ruta de *splicing* en la que interviene un intermediario en forma de lazo. Los intrones del grupo I necesitan un residuo de guanosina iniciador para el proceso de *splicing*. Los intrones de los genes de ARNt de eucariotas y los encontrados en ARNt y ARNr de arqueas sufren maduración mediante una ruta en la que están implicadas las enzimas endonucleasa y ligasa.

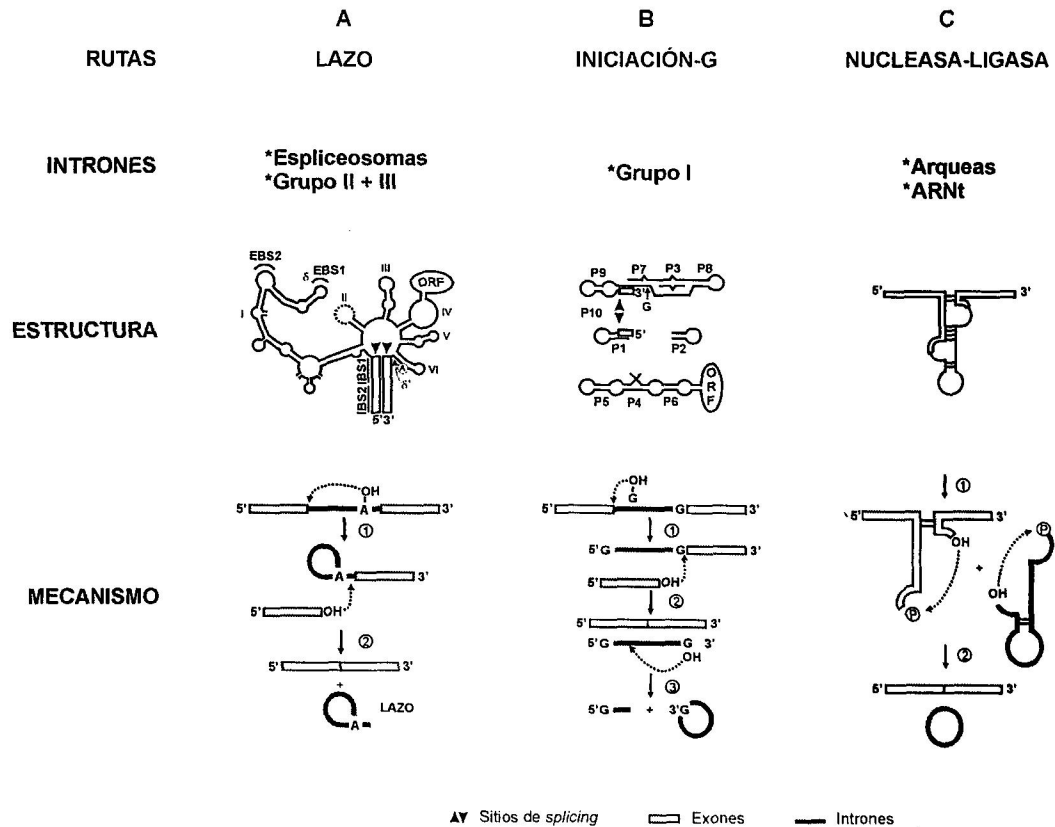


Figura 3. Rutas de *splicing* de intrones y sus estructuras. Los intrones han sido agrupados de acuerdo a su ruta de *splicing*.

Muchos intrones del grupo I y II y algunos intrones de arqueas presentan un marco abierto de lectura (ORF) dentro del intrón. Estos ORFs codifican diferentes proteínas, con funciones relacionadas con la movilidad del intrón a nivel genómico. El término movilidad comprende dos tipos de movimientos: *homing*, muy eficiente, y transposición, menos eficiente. El proceso denominado *homing* implica la invasión del intrón en el mismo sitio de inserción de un alelo conocido carente de intrón (Dujon *et al.*, 1989). Si este movimiento se realiza a través de un intermediario de ARN se

denomina *retrohoming*. En el proceso de transposición, el intrón invade lugares no alélicos (ectópicos) (Cech, 1985; Lambowitz, 1989; Sharp, 1985).

Los intrones del grupo I han sido encontrados en ARNt, ARNr y ARNm de organelas de hongos, plantas y protistas (Michel *et al.*, 1989), en ARNt y ARNm de bacterias/bacteriófagos (Michel y Ferat, 1995), en ARNr de protistas y hongos (Jacquier, 1996) y en casos aislados en ARNm de mitocondrias de animales (Qin y Pyle, 1998), pero no han sido identificados en arqueas. Hasta la fecha se conocen más de 1.000 intrones del grupo I (<http://www.rna.icmb.utexas.edu>). Estos intrones son ribozimas con una secuencia primaria poco conservada, pero presentan una estructura secundaria y terciaria conservada consistente en varios lazos (Figura 3B). El apareamiento de bases entre las secuencias cercanas al extremo 5' del intrón con las secuencias del exón (P1-P10) define la localización del sitio de *splicing*. Los intrones del grupo I llevan a cabo el *splicing* mediante un mecanismo de transesterificación, en el que una guanosina externa es el nucleótido iniciador. La escisión del intrón se produce de forma lineal y posteriormente ocurre la circularización. El proceso de auto-*splicing* se produce *in vitro* (para la mayoría de los intrones estudiados), pero se requiere la presencia de la proteína para que el *splicing* ocurra *in vivo*. La proteína codificada por estos intrones (IEP, presente sólo en un tercio de los intrones conocidos) se localiza en una de varias vueltas de la estructura secundaria conservada y codifica funciones para el *splicing* (actividad maturasa), reconociendo sitios específicos del intrón para promover el plegamiento del precursor de ARN y la catálisis. Se han identificado varios factores codificados por la célula hospedadora que intervienen junto con la IEP en este proceso (Lambowitz y Perlman, 1990; Lambowitz *et al.*, 1999). Las maturasas de los intrones de mitocondrias de levaduras están relacionadas con la familia de ADN endonucleasas LAGLIDADG. Son sintetizadas como fusiones quiméricas que posteriormente son procesadas a la forma madura, siendo los motivos de esta proteína críticos para la actividad catalítica. Los factores auxiliares para llevar a cabo el *splicing* se pueden agrupar en dos categorías: factores que se unen al intrón y permanecen unidos para estabilizar la estructura para el *splicing* (Clodi *et al.*, 1999; Weeks *et al.*, 1996) y ARN chaperonas, que facilitan el plegamiento del ARN en una forma catalíticamente activa, pero no son requeridos para el *splicing* una vez que se ha formado dicha estructura (Clodi *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1995).

Los intrones del grupo II se han localizado en ARNr, ARNt y ARNm de organelas de hongos, plantas y protistas (Michel *et al.*, 1989) y en ARNm y secuencias de

inserción de bacterias (Michel y Ferat, 1995; Martínez-Abarca *et al.*, 1998). Proyectos de secuenciación genómica han puesto de manifiesto la existencia de estos intrones también en arqueas (Toro, 2003). Los intrones del grupo II son elementos ribozímicos con una arquitectura tridimensional compuesta por 6 dominios (dI a dVI). El centro catalítico está formado por los dominios dI y dV y realizan *splicing* en la secuencia consenso 5'-GUGYG...AY-3'. El *splicing* ocurre por una reacción de transesterificación en 2 pasos, siendo el nucleótido iniciador la adenosina del dVI (Figura 3A). La escisión del intrón se realiza en forma de lazo. La proteína codificada por el intrón, IEP, (localizada en el dominio dIV) codifica funciones para *splicing* y movilidad (actividades maturasas, reverso transcriptasa y endonucleasa), necesitándose, además, algunas funciones aportadas por la maquinaria celular hospedadora para completar el proceso de *homing*. Los intrones del grupo II presentan una secuencia primaria poco conservada. La clasificación de los intrones del grupo II se basa en estudios comparativos de los elementos que los caracterizan, tales como el sitio consenso de *splicing* 3' (Michel *et al.*, 1989), la distancia de la adenosina catalítica al extremo 3' (Michel y Ferat, 1995) y presencia de determinadas interacciones terciarias (Jacquier, 1996), concluyendo en una clasificación basada en las relaciones filogenéticas de los ORFs y ARNs (Qin y Pyle, 1998; Martínez-Abarca y Toro, 2000a; Zimmerly *et al.*, 2001; Toor *et al.*, 2001; Toro *et al.*, 2002).

Los intrones del grupo III pertenecen a un grupo muy reducido de intrones tipo-grupo II. Se han encontrado en ARNm de plastidios en protistas euglenoides. Presentan el dominio dVI y la adenosina catalítica típicos de intrones del grupo II. El *splicing* ocurre por transesterificación en dos pasos iniciada por la adenosina y el intrón se escinde en forma de lazo. Los ORFs presentan homología con maturasas y reverso transcriptasas de intrones del grupo II. Se han encontrado unas estructuras de intrón dentro de intrón (twintron) en algunos intrones del grupo II y grupo III en plastidios euglenoides (Bonen y Vogel, 2001).

4.1.- Intrones del grupo II

El número de intrones del grupo II identificados hasta la fecha es aún pequeño, aunque se encuentra en continuo aumento. Muchos de ellos han sido inferidos a partir búsquedas de homologías en las bases de datos con reverso transcriptasas o maturasas codificadas por intrones conocidos. Los intrones del grupo II son moléculas de ARN

catalíticas de gran tamaño, variando desde 500 a más de 1.000 nucleótidos de longitud. Existen varias líneas de evidencia estructural y mecanística que sugieren una fuerte relación entre los intrones del grupo II y los espliceosomas eucarióticos (Sontheimer *et al.*, 1999). Entre ellas se encuentran las similitudes en los mecanismos de reacción y secuencias consenso para el *splicing*, la analogía entre la estructura y función de los dominios de los intrones del grupo II y los de los ARNsn, la habilidad de los dominios de los intrones tipo ARNsn para asociarse en *trans* y al descubrimiento de algunos intrones del grupo II como elementos génicos móviles, sugiriendo cómo podrían haberse dispersado en los genomas nucleares (Michel y Ferat, 1995; Lambowitz *et al.*, 1999). Todos estos datos sugieren un escenario en el que los intrones móviles del grupo II invadieron genomas nucleares, degeneraron (perdiendo la movilidad, pero conservando la capacidad de realizar *splicing*) y sus dominios dieron lugar a los ARNsn.

A pesar de la relativa ausencia de conservación de secuencia primaria de ADN entre los intrones del grupo II, todos ellos poseen una organización conservada de 6 dominios, que contiene elementos estructurales secundarios bien definidos (Michel *et al.*, 1989) (Figura 4). Se han desarrollado numerosos sistemas para estudiar las funciones específicas de cada dominio y las reacciones cinéticas (Michels y Pyle, 1995) llegando a caracterizar un gran número de interacciones terciarias, particularmente entre los dominios I y V (Koch *et al.*, 1992; Michels y Pyle, 1995; Qin y Pyle, 1998; Costa y Michel, 1995, 1997; Podar *et al.*, 1998; Konforti *et al.*, 1998; Jestin *et al.*, 1997), definiendo un núcleo funcional en la molécula de ARN. Todos estos datos establecen que las ribozimas de los intrones del grupo II son moléculas con una estructura muy estable y relativamente estática. Aunque se han realizado un gran número de estudios bioquímicos demostrando la implicación de numerosos nucleótidos en las interacciones terciarias, no se ha llegado a conocer la estabilidad relativa y el ambiente molecular del aparato catalítico (Swisher *et al.*, 2001).

Los intrones del grupo II codifican proteínas que presentan actividad reverso transcriptasa, necesaria junto con el ARN del intrón para la movilidad, así como actividad matorasa, para realizar el *splicing* del ARN. Las proteínas codificadas por estos intrones (IEPs) se localizan en el dominio dIV, fuera del núcleo catalítico del intrón, y presentan 3 importantes dominios conservados: N-terminal, dominio reverso transcriptasa (RT); dominio X, asociado a la actividad matorasa para el *splicing* y C-terminal, dominio ADN endonucleasa, implicado en la movilidad (no presente en todas

del *splicing* encuentran una diana de ADN con secuencia específica (exones fusionados carentes de intrón). El intrón se integra entre las secuencias exónicas del ADN mediante un mecanismo de *splicing* reverso completo o parcial. Entonces, el dominio ADN endonucleasa corta la cadena antisentido del ADN hacia el extremo 3' de la unión de los exones y la RT transcribe reversamente el ARN del intrón empleando el extremo 3' de la cadena cortada como un cebador. La integración del intrón se completa por enzimas reparadores de la célula hospedadora (Figura 5A). Además de realizar *homing* (*retrohoming* si el proceso ocurre via un intermediario de ARN), los intrones del grupo II pueden realizar retrotransposición a sitios ectópicos (Figura 5A-C), que se asemejan al sitio de *homing*, a baja frecuencia, promoviendo de esta manera su dispersión a diferentes localizaciones del genoma.

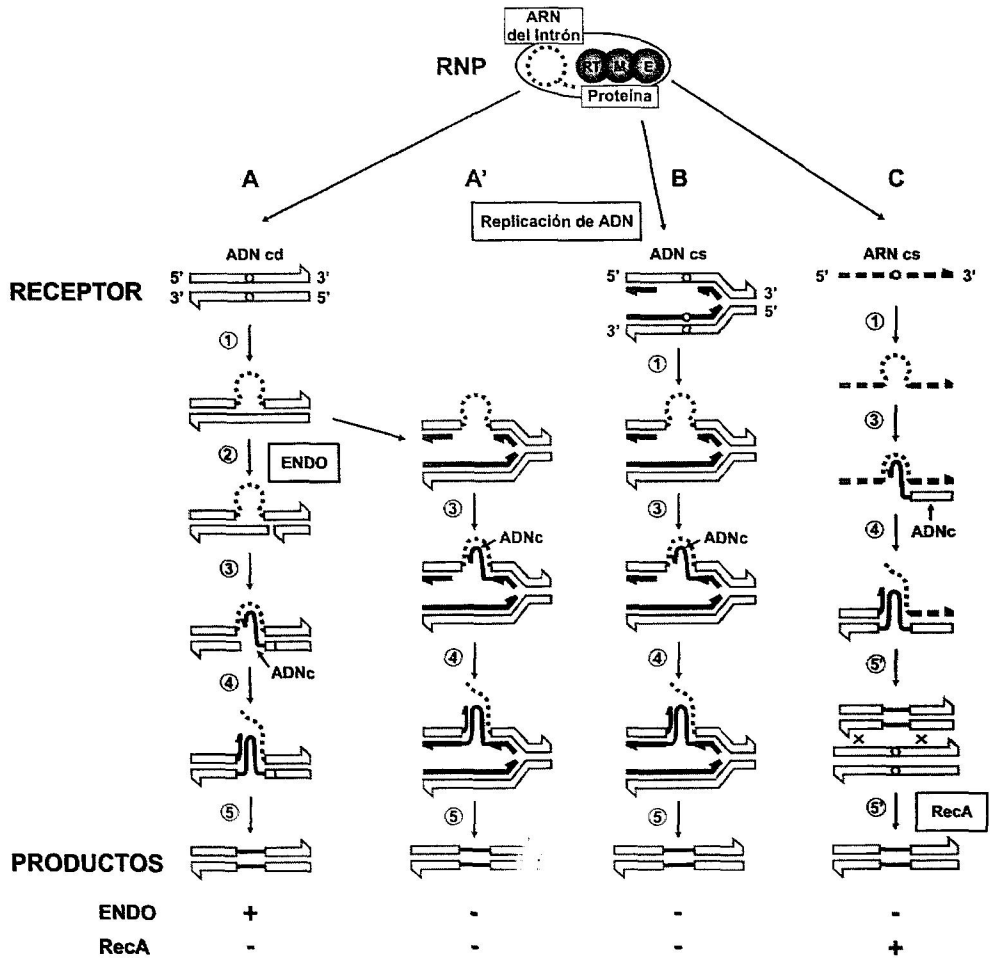


Figura 5. Posibles rutas de movimiento de los intrones del grupo II, *retrohoming* (A) y retrotransposición (A-C). Las secuencias diana para el *splicing* reverso son ADN de cadena doble (A, A'), ADN de cadena sencilla (B) o ARN de cadena sencilla (C). Las rutas A' y B están unidas a la replicación del ADN. Los requerimientos de las actividades RecA bacteriana y endonucleasa (endo) del intrón se indican en la parte inferior de la figura. Las reacciones son las siguientes: 1, *splicing* reverso en diana de

ADN o ARN; 2, corte en la cadena antisentido por la actividad endonucleasa de la proteína codificada por el intrón; 3, síntesis de ADNc por la actividad reverso transcriptasa de la IEP; 4, eliminación del ARN del intrón y síntesis de la segunda cadena de ADNc; 5 o 5', síntesis reparadora o recombinación homóloga, respectivamente. Figura basada en el mecanismo de movimiento para el intrón LI.ltrB de *L. lactis* (Ichiyanagi *et al.*, 2002)

Para comprender cómo los intrones del grupo II se han dispersado en bacterias y organelas, se han llevado a cabo estudios de caracterización filogenética de las proteínas codificadas por estos intrones. Se han determinado tres clases de IEPs: clase mitocondrial; clases tipo-cloroplasto 1 y 2 y clases bacterianas A, B, C, D y E (Martínez-Abarca y Toro, 2000a; Zimmerly *et al.*, 2001; Toro *et al.*, 2002). Los intrones bacterianos se han localizado en todas las clases filogenéticas, sugiriendo eventos de transferencia horizontal entre organelas y bacterias, particularmente dentro de la clase tipo-cloroplasto. El análisis evolutivo de las estructuras secundarias de los ARNs muestra que la estructura del ARN coevoluciona con las RTs, dado que cada clase filogenética de ORF está asociada a una estructura particular de ARN (Toor *et al.*, 2001; Dai y Zimmerly, 2002).

Se ha descrito que los intrones del grupo II poseen la capacidad de portar marcadores genéticos adicionales en su secuencia sin afectar al mecanismo de movilidad (Matsuura *et al.*, 1997; Cousineau *et al.*, 1998). Los intrones insertados en la cadena antisentido del ADN no pueden realizar *splicing*, provocando disrupciones génicas permanentes. Los que se insertan en la orientación sentido pueden ser empleados para interrupciones temporales, mediante el control de la síntesis de la proteína del intrón bajo la acción de un promotor inducible. De este modo, el ARN transcrito del gen conteniendo el intrón sufriría *splicing*, liberando los exones para ser traducidos correctamente. Esta propiedad abre una puerta hacia la manipulación génica dirigida a introducir nueva información en localizaciones del genoma deseadas. Estas secuencias diana no tienen que ser estrictamente las secuencias diana específicas para la inserción del intrón. Varios estudios han puesto de manifiesto la posibilidad de redirigir la inserción del intrón hacia una secuencia concreta mediante modificación de las secuencias IBSs del intrón para el reconocimiento de la secuencia diana (Guo *et al.*, 2000; Jiménez-Zurdo *et al.*, 2003). En la actualidad se están realizando investigaciones para determinar si los genes eucarióticos pueden ser eficientemente invadidos por intrones del grupo II. El estudio del mecanismo de movimiento de este tipo de

retroelementos puede conducir al desarrollo de nuevas técnicas que podrían facilitar el análisis de genomas eucarióticos que presentan deficiencia en mecanismos de recombinación y representan una herramienta de gran potencial para aplicaciones de terapia génica.

4.1.1.- El intrón del grupo II RmInt1 de *S. meliloti*

RmInt1 fue descrito por primera vez por Martínez-Abarca *et al.* (1998). En el curso de la secuenciación del plásmido pRmeGR4b, nuestro grupo encontró una nueva secuencia de inserción en la cepa GR4, denominada IS*Rm2011-2*. Esta IS se hallaba interrumpida por una secuencia de 1.884 pares de bases con un porcentaje de identidad del 63% con el intrón del grupo II IntB de *E. coli*. La proteína codificada por RmInt1 presenta los 7 dominios de la RT y el dominio X (maturasa), pero carece de dominio ADN endonucleasa. El ARN del intrón puede ser plegado en una estructura secundaria típica de intrones del grupo II (Figura 6).

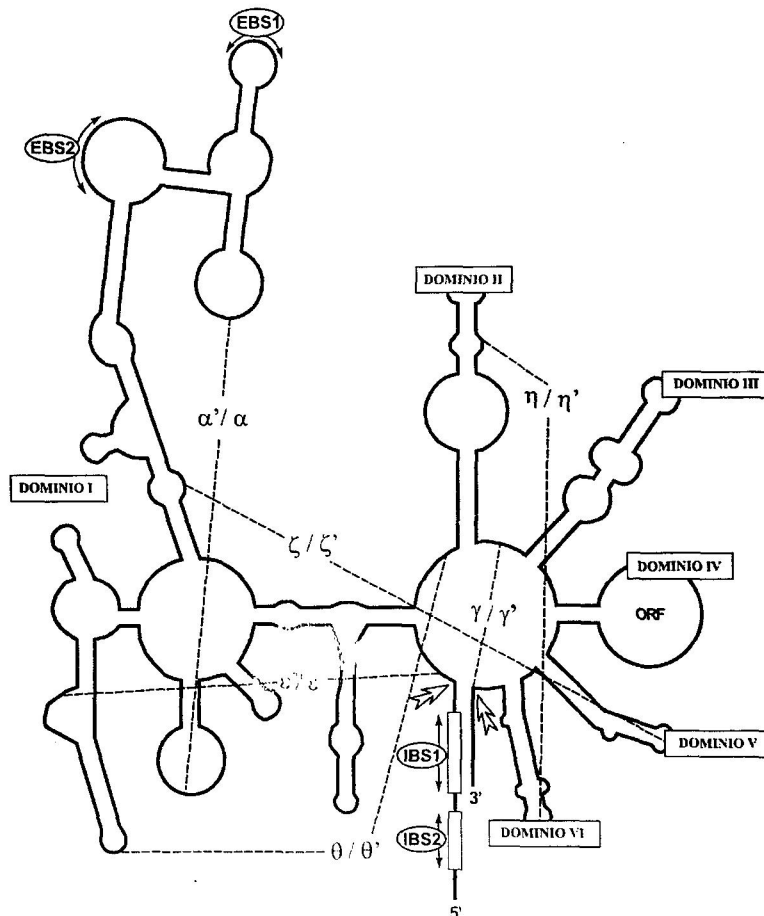


Figura 6. Representación esquemática del intrón del grupo II RmInt1. Este intrón puede ser plegado

en una estructura secundaria típica de intrones del grupo II. En el esquema se indican los dominios I a VI, señalando el ORF contenido en el dominio IV. Las secuencias de unión a exones (EBS1 y EBS2) y las secuencias de unión al intrón (IBS1 e IBS2) se indican con flechas de doble punta. Las flechas blancas indican los sitios de corte para la inserción del intrón RmInt1 entre los exones 5' y 3'. Las líneas punteadas muestran las interacciones terciarias.

En estudios iniciales realizados con RmInt1 se demostró, mediante la técnica de RT-PCR, la capacidad de este intrón de llevar a cabo *splicing* en cepas de *E. coli* conteniendo el intrón clonado en un plásmido expresado bajo el control del promotor T7. De esta manera se puso de manifiesto por primera vez la funcionalidad de RmInt1 *in vivo*. Además, en ensayos empleando cepas conteniendo el intrón con la proteína mutada, el *splicing* se redujo, indicando la función maturasa de la IEP. En contraste con otros intrones del grupo II, el intrón RmInt1 carece de dominio ADN endonucleasa, descrito como necesario en el proceso de *homing* para realizar corte en la cadena antisentido del ADN diana (Matsuura *et al.*, 1997). Para analizar la capacidad de movimiento de RmInt1 se diseñaron nuevos experimentos. Se clonó un alelo sin intrón del sitio de *homing* para RmInt1 (ISRm2011-2) en un vector de amplio rango de hospedador y de medio número de copias y fue introducido en dos cepas de *Sinorhizobium*: *S. meliloti* GR4, portando 9 copias de RmInt1 en su genoma y *S. medicae* RMS16, carente de intrón. Tras el análisis del conjunto de plásmidos transconjugantes se pudo observar el plásmido producto de *homing* en GR4, pero no en RMS16. Estos resultados sugirieron que el intrón fue capaz de moverse desde el cromosoma de GR4 al sitio diana del plásmido receptor. Este producto de *homing* no pudo ser detectado cuando se deleccionó el sitio diana para la inserción en el plásmido receptor. Además, el *homing* ocurrió en una cepa mutante en el gen *recA*, indicando que los mecanismos de recombinación no estaban implicados en el proceso (Martínez-Abarca *et al.*, 2000; Martínez-Abarca y Toro, 2000), resultado similar al obtenido para el intrón de *L. lactis* Ll.ltrB.

Se han llevado a cabo numerosos estudios en nuestro laboratorio para profundizar en los mecanismos moleculares implicados en el movimiento del intrón, tanto *in vivo* (Jiménez-Zurdo *et al.*, 2003) como *in vitro*, resultados que se presentan en el capítulo V de este trabajo de Tesis (Muñoz-Adelantado *et al.*, 2003).

The first part of the paper discusses the importance of the study and the objectives of the research. It highlights the need for a comprehensive understanding of the subject matter and the role of the researcher in this process.

The second part of the paper focuses on the methodology used in the study. It details the research design, data collection methods, and the analytical techniques employed. The author emphasizes the rigor and transparency of the research process to ensure the validity and reliability of the findings.

The third part of the paper presents the results of the study. It includes a detailed description of the data and the statistical analysis performed. The findings are discussed in the context of the research objectives and the existing literature, highlighting the contributions of the study to the field.

The final part of the paper discusses the implications of the findings and offers suggestions for future research. It concludes by summarizing the key points of the study and the author's reflections on the research process.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- MEDIOS DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS

1.1.- Medios para *Rhizobium* y *Agrobacterium*

El medio completo utilizado para el crecimiento rutinario de *Rhizobium* y *Agrobacterium* fue TY (Beringer, 1974):

CaCl ₂ .2H ₂ O	0,9	g
Triptona (DIFCO)	5	g
Extracto de levadura (DIFCO)	3	g
Agua (desionizada)	1.000	ml

Para la preparación del medio sólido se añadió agar (PANREAC) al 1,6%. La esterilización se realizó en autoclave durante 20 minutos a 120°C.

Para la obtención de partículas de ribonucleoproteína de RmInt1 se obtuvieron mejores resultados creciendo las cepas de *Rhizobium* en el medio completo TY modificado:

NaCl	1,25	g
Peptona Triptona (DIFCO)	8	g
Extracto de levadura (DIFCO)	5	g
Agua (desionizada)	1.000	ml

Para la preparación del medio sólido se añadió agar (PANREAC) al 1,6%. La esterilización se realizó en autoclave durante 20 minutos a 120°C.

El medio mínimo utilizado fue el de Robertsen *et al.* (1981), modificado según se especifica a continuación:

K ₂ HPO ₄	0,3	g
KH ₂ PO ₄	0,3	g

Material y Métodos

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)	1.000	ml

Para solidificar el medio se añadió agar purificado (OXOID) al 1,6%. El pH se ajustó de 6,8 a 7,0 y se esterilizó durante 20 minutos a 120°C.

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

1.2.- Medios para *E. coli* y *Pseudomonas*

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

NaCl	5	g
Triptona (DIFCO)	10	g
Extracto de levadura	5	g
Agua (desionizada)	1.000	ml

Para solidificar el medio se añadió agar (PANREAC) al 1,6%. El medio se esterilizó igualmente a 120°C durante 20 minutos.

La temperatura de incubación para *E. coli* fue de 37°C y para *Pseudomonas* fue de 30°C.

1.3.- 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% (v/v). Los criotubos se congelaron rápidamente y se almacenaron a una temperatura de -80°C , siendo viables durante varios años.

2.- ANTIBIÓTICOS

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se hizo a partir de soluciones 100 veces concentradas de los mismos preparadas en agua desionizada (Km, Ap) o en agua-etanol al 50% (Tc). Las soluciones preparadas en agua se esterilizaron por filtración utilizando unidades Minisart[®] NML (Sartorius) de $0,2\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro. Las concentraciones finales en los medios de cultivo están indicadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones finales de los antibióticos utilizados.

Antibiótico	Bacteria <i>E. coli</i>	<i>Rhizobium</i> , <i>Agrobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>
Tetraciclina (Tc, SIGMA)	10 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	10 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	10 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
Kanamicina (Km, BOEHRINGER)	50 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	180 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	25 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
Ampicilina (Ap, SIGMA)	200 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	200 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

3.- ENSAYOS CON PLANTA

3.1.- Planta

La planta usada en la mayoría de los ensayos fue *Medicago sativa* L. (alfalfa), ecotipo Aragón. Para determinados estudios se utilizó *Medicago polymorpha* L., *Sesbania rostrata*, *Leucaena gigante* y *Vigna unguiculata*.

3.2.- Esterilización de semillas

3.2.1.- *Medicago sativa* y *Medicago polymorpha*

- 1) Colocar de 15 a 20 gramos de semillas en un tubo de ensayo con tapón de rosca, de modo que el volumen ocupado por las semillas no sea superior a la mitad del tubo
- 2) Añadir HgCl₂ al 2,5% hasta cubrir por completo las semillas
- 3) Realizar durante 9 minutos y medio suaves inversiones del tubo para un eficaz acceso del HgCl₂ a la superficie de todas las semillas
- 4) Desechar el HgCl₂ y lavar 4 veces con abundante agua estéril
- 5) Dejar las semillas embebidas en agua estéril durante 2 horas
- 6) Eliminar el agua
- 7) Colocar las semillas bien separadas entre sí sobre papel de filtro estéril embebido en agua estéril dentro de una placa petri e incubar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 24-48 horas, dejándolas germinar hasta que las raíces alcancen 1-2 cm de longitud
- 8) Las semillas están preparadas para ser empleadas en ensayos de campo o en cultivos axénicos

3.2.2.- *Sesbania rostrata*

El protocolo para la esterilización y germinación de semillas de *Sesbania rostrata* ha sido elaborado según describe Goethals *et al.* (1990).

- 1) Esterilizar en proporción 20 gramos de semillas en 50 ml de H₂SO₄ en un matraz durante 2 horas
- 2) Realizar 5 lavados con H₂O:TE (proporción 4:1) estéril
- 3) Lavar 2 veces con agua estéril
- 4) Mantener las semillas sumergidas en NaClO durante 1 minuto
- 5) Lavar 2 veces con agua estéril
- 6) Sumergir las semillas en una solución compuesta por HgCl₂ al 0,5% en agua estéril adicionada de 0,5 ml de SDS al 10% por cada litro de HgCl₂
- 7) Lavar 2 veces con TE
- 8) Lavar con agua estéril
- 9) Dejar las semillas embebidas en agua durante 2-3 horas

10) Colocar las semillas bien separadas entre sí sobre papel de filtro estéril embebido en agua estéril dentro de una placa petri. Incubar a 28-30°C en la oscuridad durante 24-48 horas

3.2.3.- *Leucaena gigante*

El método de esterilización empleado para estas semillas se basa en el descrito por Fernández-López *et al.* (1998a).

- 1) Esterilizar las semillas con H₂SO₄ durante 15 minutos
- 2) Lavar con abundante agua estéril 5 veces
- 3) Sumergir las semillas en etanol al 96% durante 1-2 minutos
- 4) Eliminar el etanol y aplicar HgCl₂ diluido en agua estéril en proporción 1:500 durante 4 minutos
- 5) Lavar con agua estéril 7 veces
- 6) Colocar las semillas en placa para su germinación a 28°C como se indica anteriormente

3.2.4.- *Vigna unguiculata*

Las semillas de esta planta leguminosa se esterilizan como indican Fernández-López *et al.* (1998a).

- 1) Sumergir las semillas en un matraz conteniendo etanol al 96% durante 3 minutos
- 2) Lavar 5 veces con agua destilada estéril
- 3) Mantener las semillas en imbibición durante 2 horas
- 4) Germinar las semillas colocadas en papel de filtro en placa durante 48 horas en la oscuridad a 28°C

3.3.- Solución nutritiva

3.3.1.- *Medicago sativa* y *Medicago polymorpha*

Para los cultivos hidropónicos de alfalfa y polimorfa se utilizó la solución nutritiva libre de nitrógeno de Rigaud y Puppo (1975) modificada:

KH ₂ PO ₄	0,2	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2	g
KCl	0,2	g
CaSO ₄	0,12	g
Microelementos		
EDTA FeNa ₂	0,05	g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,00011	g
H ₃ BO ₃	0,00285	g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0030	g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0005	g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0002	g

El pH se ajustó a 7,8 y se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

3.3.2.- *Sesbania rostrata*, *Leucaena gigante* y *Vigna unguiculata*

La solución nutritiva empleada para el cultivo de estas leguminosas es el medio Norris (van den Eede *et al.*, 1992). Se preparan cuatro soluciones madre concentradas:

Solución A, 100x

KCl	14,9	g
K ₂ HPO ₄	5	g
KH ₂ PO ₄	10	g
Agua desionizada	1.000	ml

Solución B, 100x

MgSO ₄ .7H ₂ O	49,3	g
Agua desionizada	1.000	ml

Solución C, 2.000x

CuSO ₄ .5H ₂ O	0,075	g
--------------------------------------	-------	---

ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22	g
MnSO ₄ .2H ₂ O	0,2	g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,01	g
H ₃ BO ₃	0,715	g
Agua desionizada	500	ml

Solución D, 1.000x

FeSO ₄ .7H ₂ O	1,25	g
Acido cítrico	1,25	g
Agua desionizada	250	ml

Un litro de medio Norris contiene:

CaSO ₄ .2H ₂ O	0,35	g
Solución A	10	ml
Solución B	10	ml
Solución C	0,5	ml
Solución D	1	ml
Agua desionizada	1.000	ml

El pH se ajustó a 7 y se esterilizó a 120°C durante 20 minutos.

3.4.- Cultivo axénico de plantas

3.4.1.- *Medicago sativa* y *Medicago polymorpha*

Se realizó el cultivo axénico de plantas según la técnica descrita por Olivares *et al.* (1980).

- 1) Colocar las semillas germinadas en condiciones asépticas en tubos de 20 x 200 mm conteniendo 10 ml de solución nutritiva y un soporte de papel de filtro
- 2) Dejar los tubos con plantas en la oscuridad durante dos días
- 3) Cubrir los tubos en su mitad inferior con papel opaco para evitar que la luz incida directamente sobre las raíces

4) Colocar los tubos en la cámara de cultivo de plantas mantenida en las siguientes condiciones: 500 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ (400 a 700 nm) de intensidad luminosa, fotoperíodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), 25°C/18°C de temperatura (día/noche) y 50% de humedad relativa

3.4.2.- *Sesbania rostrata*, *Leucaena gigante* y *Vigna unguiculata*

- 1) Colocar las semillas germinadas en condiciones asépticas en jarras Leonard estériles conteniendo vermiculita como sustrato para las raíces
- 2) Inocular las semillas con 1 ml del cultivo bacteriano crecido durante 24 horas
- 3) Cubrir la jarra con perlita estéril
- 4) Crecer las plantas en la cámara de cultivo mantenida en las siguientes condiciones: 500 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ (400 a 700 nm) de intensidad luminosa, fotoperíodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), 25°C/20°C de temperatura (día/noche) y 50% de humedad relativa
- 5) Recoger las plantas al cabo de 25 días tras la inoculación y comprobar el estado de nodulación

3.5.- Inoculación de las plantas

La inoculación de las plantas de alfalfa y polimorfa se realizó tras 10 días de permanencia en la cámara de cultivo, añadiendo a cada tubo 1 ml de una suspensión bacteriana de la(s) cepa(s) correspondiente(s) (10^5 a 10^6 células/ml). En caso de que el medio de cultivo contenga antibióticos, las células se lavan varias veces con medio de cultivo sin inocular mediante centrifugación y resuspensión suave de las bacterias en una microfuga de mesa (5.000 r.p.m.).

3.6.- Medida de la competitividad por la ocupación de nódulos

Para estudiar la competitividad por la ocupación de nódulos se coinocularon la cepa muestra GR4 con otra cepa (5D19) marcada portando el plásmido pGUS3, conteniendo el gen *gusA* (*uidA*) que codifica la enzima β -glucuronidasa de *E. coli*. Esta enzima es capaz de transformar el sustrato X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico) en un producto de color azul (Sharma y Signer, 1990). Este sistema puede ser empleado

en placas de medio sólido con el sustrato, pero parece que el crecimiento de las bacterias se ve afectado por la presencia del producto insoluble. En estudios histoquímicos este sistema permite la tinción de nódulos enteros para conocer el contenido bacteriano (Streit *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1991; García-Rodríguez y Toro, 2000). La competitividad de una cepa se determinó por el porcentaje de nódulos que ocupa.

- 1) Crecer las cepas a ensayar en medio TY con antibióticos si fuera necesario hasta la fase exponencial (D.O._{600nm} de 0,4 a 0,6)
- 2) Cuando los dos cultivos alcanzan la misma D.O._{600nm}, se lavan con agua desionizada y diluyen 1.000 veces en proporción 1:1 con agua desionizada
- 3) Inocular 12 tubos de plantas (1 planta/tubo, cultivadas durante 10 días) con 1 ml de una suspensión bacteriana (10^6 cél/ml) conteniendo ambas cepas
- 4) Recoger las plantas al cabo de 14-15 días tras la inoculación
- 5) Lavar las raíces con agua desionizada
- 6) Sumergir las raíces en una solución de X-Gluc 1 mM (APOLLO SCIENTIFIC) en tampón sodio-fosfato 50 mM (pH 7,5) con SDS 1 % (sodio-dodecil- sulfato)
- 7) Incubar a 37°C durante toda la noche
- 8) Hacer recuento de nódulos blancos y azules para determinar la ocupación de cada cepa

3.7.- Aislamiento de nódulos

Para realizar el estudio de las cepas bacterianas nodulantes de *M. sativa* se aislaron y analizaron los nódulos, según la técnica descrita por Olivares *et al.* (1980). Los nódulos se recortaron dejando unos milímetros de raíz a ambos lados de su base, evitando la rotura del nódulo y la pérdida de los bacteroides. A continuación fueron esterilizados en superficie y conservados en una solución estéril de glicerol al 20%, congelados a -70°C para su posterior estudio.

- 1) Se colocan los nódulos en un tubo eppendorf hasta completar la mitad del volumen del tubo
- 2) Añadir 1 ml de HgCl₂ al 0,25% hasta cubrirlos

- 3) Realizar suaves movimientos de inversión durante 4 minutos
- 4) Desechar el HgCl₂ y lavar 4 veces con 1 ml de agua estéril
- 5) Colocar cada nódulo en un tubo eppendorf con una gota de agua estéril
- 6) Triturar el nódulo con una varilla de vidrio esterilizada
- 7) Extender la gota en una placa de petri con medio TY
- 8) Incubar durante 2-3 días a 28°C hasta la formación de colonias individuales

4.- EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL

La siguiente técnica consiste en la obtención de ADN de forma cruda, descrito por Villadas *et al.* (1995). Este protocolo es adecuado para la extracción de gran número de muestras de ADN que va a ser analizado mediante la técnica de PCR.

4.1.- Obtención de lisados a partir de colonias

- 1) Picar una colonia con un palillo estéril
- 2) Resuspender en un tubo eppendorf conteniendo 100 µl de agua desionizada estéril con 0,1% N-lauroil sarcosina
- 3) Centrifugar las células 2 min
- 4) Eliminar el sobrenadante y lavar 2 veces con 100 µl de agua desionizada estéril, resuspendiendo las bacterias tras el último lavado
- 5) Llevar a ebullición durante 10 min
- 6) Centrifugar 2 min
- 7) Usar 4 µl del sobrenadante como molde de ADN para la reacción de PCR

Cuando el ADN molde para las reacciones de PCR debe ser de mayor calidad que el obtenido mediante la técnica anterior, se procede a emplear el siguiente método, diseñado para *Rhizobium* en el departamento de Genética de la Universidad de Bielefeld (Alemania).

4.2.- Obtención de ADN total a partir de cultivo bacteriano en medio líquido

- 1) Picar una colonia con un palillo estéril

- 2) Inocular 3 ml de TY líquido e incubar en agitación a 28°C durante 2 días hasta alcanzar la fase logarítmica
- 3) Recoger 1,5 ml y centrifugar durante 2 min en una microfuga
- 4) Lavar las células con 0,5 ml de tampón TE pH 8 adicionado de N-lauroil sarcosina al 0,1%
- 5) Resuspender en 1 ml de NaCl 1 M y mantener la suspensión durante 2 h a 4°C, realizando movimientos de inversión cada 15 min
- 6) Centrifugar durante 2 min, eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento mediante el uso de vórtex hasta homogeneidad en 0,25 ml de sacarosa al 20% en TE
- 7) Añadir 0,25 ml de TE con lisozima (5 mg/ml) y agitar por inversión
- 8) Incubar durante 30 min a 37°C
- 9) Adicionar 0,1 ml de TE con N-lauroil sarcosina al 5% y pronasa (ROCHE) (predigerida durante 1 hora a 37°C) a una concentración final de 10 mg/ml e incubar una hora más a 37°C
- 10) Agregar 70 µl de acetato sódico 3 M pH 5,2, 0,2 ml de mezcla 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) y 0,2 ml de mezcla de fenol
- 11) Agitar en vórtex y centrifugar durante 10 min
- 12) La fase superior se recoge, con cuidado de no distorsionar la interfase, en un nuevo tubo y se le añade 0,2 ml de fenol
- 13) Agitar en vórtex y centrifugar durante 5 min
- 14) Recoger el sobrenadante en un nuevo tubo y adicionar 0,3 ml de cloroformo
- 15) Agitar en vórtex y centrifugar durante 5 min
- 16) A la fase superior recogida en un tubo nuevo se le añade 0,7 ml de isopropanol preenfriado a -20°C
- 17) Mezclar bien por inversión y mantener a -70°C durante 15 min
- 18) Centrifugar 15 min y eliminar el sobrenadante
- 19) Lavar el precipitado con 0,5 ml de etanol al 70%
- 20) Secar al vacío a 55°C durante 5 a 10 min
- 21) Resuspender en 20 µl de agua o TE pH 8 diluido 1/10, al que se le añadió 1 µl de una solución de ARNasa (concentración de 10 mg/ml) 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).

5.- AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO

5.1.- Minipreparación de plásmidos por lisis alcalina

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

- 1) Recoger por centrifugación 1,5 ml de cultivo bacteriano crecido hasta fase exponencial en un tubo eppendorf
- 2) Resuspender en 100 µl de solución I (glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM pH 8; EDTA Na₂ 10 mM) conteniendo lisozima 4 mg/ml
- 3) Dejar 5 min a temperatura ambiente
- 4) Añadir 200 µl de solución II (NaOH 0,2 M; 1% SDS)
- 5) Agitar invirtiendo el tubo y dejar 5 min en hielo
- 6) Adicionar 150 µl 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 desionizada)
- 7) Agitar por inversión y dejar 5 min en hielo
- 8) Centrifugar a 15.000 r.p.m. durante 5 minutos
- 9) Se cambia el sobrenadante (400 µl) a un nuevo tubo y se añade un volumen igual de una solución de fenol:cloroformo (1:1)
- 10) Mezclar con vórtex, separar las dos fases por centrifugación a 15.000 r.p.m. durante 5 min
- 11) Añadir al sobrenadante en un nuevo tubo 0,3 ml de cloroformo
- 12) Mezclar con vórtex y centrifugar a 15.000 r.p.m. durante 5 min
- 13) Pasar el sobrenadante (fase acuosa) un nuevo tubo y añadir 2 volúmenes de etanol 100% a -20°C
- 14) Mezclar bien y dejar precipitando 15 min a -70°C
- 15) Centrifugar 15 min a 15.000 r.p.m. y lavar el precipitado con etanol al 70%

16) Volver a centrifugar durante 3 min

17) Por último desecar al vacío y resuspender en tampón TE o agua desionizada (25 µl)

Para eliminar el ARN presente se trató con ARNasa (1 µl) de una solución concentrada (10 mg/ml). Esta técnica está diseñada para aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli*. Para obtener ADN plasmídico de *Rhizobium* y *Agrobacterium*, se sigue el mismo protocolo, con las siguientes modificaciones:

- 1) Tras recoger el cultivo bacteriano, lavar las células en 500 µl de sarcosil 0,1% en TE
- 2) Realizar la precipitación (paso 14) durante 5 minutos a temperatura ambiente
- 3) Centrifugar a continuación durante 5 min

5.2.- Preparación de ADN plasmídico por precipitación con sal de Magnesio

Esta técnica, basada en el método de Studier (1991), permite el aislamiento rápido de plásmidos de *E. coli*. También fue empleada para cepas de *Pseudomonas*.

- 1) Recoger por centrifugación 1,5 ml de cultivo bacteriano en un tubo eppendorf
- 2) Resuspender en 100 µl de agua desionizada
- 3) Añadir 100 µl de NaOH 0,1 M, EDTA 10 mM y 2% SDS
- 4) Mezclar en vórtex y hervir durante 2 min
- 5) Añadir 50 µl de MgCl₂ 1 M, mezclar bien y mantener 2 min a 4°C
- 6) Centrifugar 1 min y añadir 50 µl de acetato potásico 5 M
- 7) Mezclar bien y dejar en hielo 2 min
- 8) Centrifugar 1 min y pasar el sobrenadante a un nuevo tubo
- 9) Añadir 0,6 ml de etanol 95% a -20°C
- 10) Dejar precipitando durante 5 min a temperatura ambiente
- 11) Centrifugar y eliminar el sobrenadante
- 12) Lavar con 200 µl de etanol al 70%
- 13) Centrifugar, eliminar el sobrenadante y desecar al vacío
- 14) Resuspender en 30 µl de TE o agua desionizada

5.3.-“Wizard Minipreps”

Los procedimientos detallados anteriormente proporcionan gran cantidad de ADN plasmídico, pero en algunas ocasiones no es de muy buena calidad. Para ser empleados en determinados experimentos, como transformaciones o secuenciación, fue necesario llevar a cabo la purificación de los ADNs plasmídicos usando el *kit* comercial de purificación "Wizard Minipreps™" de Promega. Todas las soluciones empleadas en esta técnica son aportadas por el *kit*. El proceso se realiza a temperatura ambiente.

- 1) Recoger en un tubo de 5 a 10 ml de un cultivo bacteriano crecido hasta fase estacionaria, por centrifugación a 10.000xg durante 10 min
- 2) Resuspender mediante vórtex el precipitado en 250 µl de tampón de suspensión (Tris-HCl 50mM pH 7,5; EDTA 10 mM; ARNasa A 100µg/ml)
- 3) Añadir 250 µl de tampón de lisis (NaOH 0,2 M; SDS 1%) y mezclar 4 veces por inversión rápida
- 4) Incubar la mezcla durante 5 min hasta observar aclaramiento
- 5) Añadir 10 µl de solución de proteasa alcalina
- 6) Mezclar por inversión 4 veces y dejar 5 min
- 7) Añadir 350 µl tampón de neutralización (Guanidina HCl 4,09 M; Acetato potásico 0,759 M; Ácido acético glacial 2,12 M, pH 4,2)
- 8) Mezclar por inversión 4 veces y dejar 5 min
- 9) Centrifugar a 15.000 r.p.m. durante 10 min
- 10) Transferir el sobrenadante a una minicolumna y centrifugar durante 1 min
- 11) Eliminar el eluyente
- 12) Añadir a la minicolumna 750 µl de solución de lavado (Acetato potásico 60 mM; Tris HCl 10 mM pH 7,5; Etanol 60%)
- 13) Centrifugar a 15.000 r.p.m. durante 1 min y eliminar el eluyente
- 14) Adicionar 250 µl de solución de lavado
- 15) Centrifugar a 15.000 r.p.m. durante 1 min y desechar el eluyente
- 16) Añadir a la columna 40 µl de agua desionizada o tampón TE y centrifugar durante 1 min para eluir el ADN plasmídico

6.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA, PCR

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 μ l conteniendo 10 a 100 ng del ADN molde (4 μ l de lisado celular o ADN purificado), 25 pmol de cada uno de los cebadores específicos, 0,1 mM de deoxinucleósidos trifosfato, 2,5 μ l de 10x tampón de PCR conteniendo 15 mM MgCl₂, y 2 unidades de *Taq* ADN polimerasa. La mezcla de reacción se cubrió con 25 μ l de aceite mineral. La amplificación se realizó en un termociclador Robocycler™ 40 de Stratagene y el programa empleado varió dependiendo de la temperatura de anillamiento de los cebadores utilizados. Habitualmente, el programa consistió en una primera etapa de desnaturalización de 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 1 minuto de anillamiento a 60°C y 30 segundos de extensión a 72°C. Tras esta etapa se realizó una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio.

6.1.- PCR inversa

El ADN molde para llevar a cabo esta técnica consiste en un fragmento de restricción purificado de gel de agarosa, identificado por visualización en bromuro de etidio o por hibridación ADN-ADN, autoligado por sus extremos de restricción. Los cebadores utilizados son divergentes, dirigidos hacia los extremos del fragmento posteriormente autoligado, para amplificar de este modo las zonas desconocidas que flanquean la zona conocida.

La reacción de PCR inversa se realiza en un volumen total de 25 μ l, conteniendo de 0,1 a 2 μ l de la reacción de ligación del ADN digerido, 25 pmol de cada cebador, 0,3 mM de deoxinucleósidos trifosfato, 2,5 μ l de 10x tampón de PCR y 2 unidades de *Taq* ADN polimerasa. La mezcla de reacción se cubrió con 25 μ l de aceite mineral. El programa empleado consistió en una etapa de desnaturalización de 3 minutos a 93°C, seguido de 35 ciclos a 93°C durante 1 minuto, 1 minuto de anillamiento a la temperatura específica para cada pareja de cebadores y 2 minutos de extensión a 72°C. La reacción finaliza con 10 minutos de extensión final a 72°C.

7.- ELECTROFORESIS DE ADN

7.1.- Electroforesis en gel de agarosa

El análisis de productos de PCR, de ADN total o plasmídico o de fragmentos de restricción se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (SIGMA tipo I) al 1% sumergidos en TBE (1 litro 10x: TrisHCl 89 mM; EDTA Na₂ 2,5 mM; BO₃H₂ 89 mM, pH 8,2) o TAE (1 litro 10x: TrisHCl 400 mM; EDTA Na₂ 20 mM; Ac. Acético Glacial 100% 11,42 ml). El voltaje habitual de trabajo fue de 120 V. Como solución de carga se utilizó sacarosa 40% y azul de bromofenol 0,25% en una relación 5 µl solución de ADN/1 µl solución de carga. Las fuentes utilizadas fueron Pharmacia y Bio-Rad.

7.2.- Revelado de geles y fotografía

El revelado de los geles de agarosa se realizó por inmersión de los mismos en agua conteniendo unas gotas de solución de bromuro de etidio (1 mg/ml), durante 15 a 20 min. El gel teñido se enjuagó y se observó con luz UV de 260 nm en un transiluminador.

Las fotografías de los geles se realizaron con GELPRINTER y GELSTATION de TDI para grabar y procesar las imágenes.

7.3.- Estimación de los pesos moleculares de ADN por electroforesis en gel de agarosa

La estimación del tamaño de los productos de PCR, de ADN total o plasmídico o de fragmentos de restricción se realizó a partir de la construcción de curvas patrón, representando el logaritmo del peso molecular frente a la movilidad relativa del ADN en gel, utilizando como patrones los marcadores de peso molecular de tipo II (ADN de fago λ digerido con endonucleasa *Hind*III) o tipo III (ADN de fago λ digerido con endonucleasas *Eco*RI y *Hind*III), ambos de ROCHE. También se utilizaron otros marcadores como pGEM (Promega).

7.4.- Determinación de la concentración de ADN y oligonucleótidos

La concentración de ADN en una muestra se estimó siguiendo el método espectrofotométrico descrito en Sambrook *et al.* (1989). Se midió la absorbancia de nuestra solución de ADN en agua o en TE a 260 y 280 nm utilizando como blanco agua o TE sin ADN. La concentración se determinó en función de los valores estándar de D.O._{260nm} 1 para soluciones con 50 µg/ml de ADN de cadena doble y 20 µg/ml de oligonucleótidos. La relación D.O._{260nm} / D.O._{280nm} se usó 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).

8.- MANIPULACIÓN ENZIMÁTICA DE ADN

8.1.- Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción

La digestión de ADN se realizó siguiendo las indicaciones de temperatura y tampón óptimos recomendadas por los proveedores (ROCHE y Promega).

En el caso de digestiones con 2 enzimas de restricción, se realizó de forma simultánea, eligiendo el tampón óptimo para las dos enzimas. En caso de no existir un tampón óptimo común, se digirió primero con la enzima que requiriese el tampón de menor fuerza iónica, adicionando posteriormente el tampón y la enzima para la segunda digestión.

8.2.- Ligación de fragmentos de restricción

Las reacciones de ligación se efectuaron empleando unas relaciones molares vector::inserto variables, dependiendo del tamaño de los fragmentos a clonar o de si se trataba de la ligación de extremos cohesivos o romos. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 15-20 µl en presencia de la enzima T4 ADN ligasa (ROCHE), a 14-16°C durante una noche.

9.- EXTRACCIÓN DE ADN DE GEL DE AGAROSA

9.1- Electroelución

Para purificar fragmentos de ADN desde gel de agarosa se utilizó el método de electroelución mediante membranas de diálisis. La membrana de diálisis utilizada fue de Spectra/Por (SPECTRUM Medical Industries) con tamaño de poro de 12.000 a 14.000 Da. Se describe la técnica a continuación:

- 1) La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1% en TBE o TAE. Tras la tinción con bromuro de etidio, las bandas se visualizaron con una lámpara de UV de 260 nm. Con un escalpelo, se extrajo el fragmento de agarosa que contenía la banda de ADN deseada y se colocó en un tubo eppendorf
- 2) Mientras se realiza la electroforesis, se procede a la preparación de membranas para diálisis, o si ya están preparadas, pasar al punto 6
- 3) Preparar las membranas sumergiéndolas en tampón de EDTA 1 mM y carbonato sódico 2% (p/v)
- 4) Llevar a ebullición durante 10 minutos
- 5) Lavar las membranas con agua desionizada y añadir unas gotas de etanol 100% para su conservación a 4°C
- 6) Previo a su uso, enjuagar las membranas con abundante agua desionizada para eliminar los restos de etanol
- 7) Cerrar un extremo con una pinza de tubo de diálisis
- 8) Introducir el fragmento de agarosa y añadir 500 µl de TBE o TAE, según el tampón elegido para realizar la electroforesis, cerrando el otro extremo del tubo con otra pinza sin dejar burbujas de aire
- 9) Colocar la bolsa de diálisis en una cubeta de electroforesis y aplicar un voltaje de 120 V durante 30 minutos
- 10) Invertir la polaridad durante 2 minutos a 80 V y comprobar en el transiluminador que la banda de ADN no permanece en la agarosa
- 11) Alicuotar el tampón en varios tubos eppendorf
- 12) Finalmente, añadir 10% de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol 100% para precipitar el ADN como se describe en apartados anteriores

9.2.- Purificación por columnas

El proceso de purificación de fragmentos de restricción desde gel de agarosa en TAE mediante el uso de columnas comerciales se realizó usando el *kit* Ultrafree-DA (MILLIPORE), siguiendo las recomendaciones indicadas por los proveedores. La electroforesis y aislamiento de banda de ADN se efectuó según lo descrito en el apartado anterior.

10.- HIBRIDACIÓN ADN-ADN

10.1.- Transferencia de ADN a membranas de nylon

La transferencia de fragmentos de restricción de ADN plasmídico o total a filtros de nylon se realizó según la técnica basada en el sistema VacuGene™ XL de Pharmacia siguiendo las instrucciones de los proveedores:

- 1) Realizar la electroforesis en gel de agarosa al 0,8-1% a bajo voltaje (20 a 35 V) durante 17-20 horas
- 2) Fotografíar el gel y dejar bajo la acción de los rayos UV en el transiluminador durante 15 minutos
- 3) Recortar una membrana de nylon positivamente cargada (ROCHE) de tamaño algo superior al gel de agarosa
- 4) Embeber la membrana en agua desionizada y tratarla durante 5 minutos en 20xSSC (1xSSC: NaCl 150 mM; citrato sódico 15 mM, pH 7,0)
- 5) Preparar el sistema de transferencia según las instrucciones de los proveedores. Colocar la membrana de nylon bajo una ventana de plástico de tamaño inferior al gel de agarosa. Situar encima el gel de agarosa con cuidado de no dejar burbujas de aire. Sellar los bordes del gel con agarosa fundida
- 6) Montar el aparato de transferencia y conectar el vacío utilizando la bomba VacuGene blotting pump (Pharmacia)
- 7) Sumergir el gel de agarosa en NaOH 1 M y ajustar el vacío a 55 mbar
- 8) Dejar la transferencia durante 2 horas

9) Transcurrido este tiempo, lavar el filtro de nylon en una solución de 2xSSC durante 10 minutos en suave agitación, para eliminar restos de agarosa

10) Dejar secar a temperatura ambiente y cocer la membrana al vacío durante 35 min a 120°C envuelta en papel Whatman 3MM

10.2.- Marcaje de sondas de ADN para hibridación

El marcaje de sondas para hibridación ADN-ADN se realizó principalmente mediante la técnica de PCR. En algunos casos se utilizó la técnica de marcaje mediante la enzima *Klenow*, usando como ADN molde reacciones previas de PCR de la sonda a marcar, purificados tras electroforesis en gel de agarosa.

10.2.1.- Marcaje mediante la enzima *Klenow*

- 1) Desnaturalizar 2 µg de ADN mediante ebullición durante 10 minutos
- 2) Colocarlo en hielo
- 3) Preparar un volumen de reacción conteniendo 2 µl de una mezcla de hexanucleótidos 10x (usados como cebadores), 2 µl de mezcla de marcaje DIG DNA 10x, 15 µl del ADN desnaturalizado (2 µg) y 1 µl de fragmento *Klenow* de ADN polimerasa I (ROCHE)
- 4) Añadir 20 µl de aceite mineral
- 5) Incubar a 37°C toda la noche
- 6) Parar la reacción con 2 µl de EDTA 0,2 M

10.2.2.- Marcaje mediante PCR

- 1) Mezclar en un tubo de PCR un volumen de 25 µl conteniendo 0,1 µg de ADN purificado de banda, 25 pmol de cada uno de los oligonucleótidos usados como cebadores, 0,1 mM de cada uno de los nucleótidos dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 0,1 mM de digoxigenina-11-dUTP (DIG, ROCHE) y 2,5 µl de tampón 10x específico de la enzima polimerasa
- 2) Añadir 2 unidades de *Taq* ADN polimerasa
- 3) Cubrir la mezcla con 25 µl de aceite mineral

La temperatura de anillamiento habitual de los cebadores para realizar el marcaje de sondas fue de 60°C. Finalizada la reacción de marcaje, se purificó la sonda mediante el uso de las columnas de Pharmacia Micro Spin™ S300HR Columns, siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

10.3.- Hibridación ADN-ADN con sonda no radiactiva

La hibridación del filtro de nylon se realizó siguiendo las instrucciones indicadas en el DIG Luminescent Detection Kit, de ROCHE:

- 1) Incubar el filtro en una solución de prehibridación (20 ml/100 cm²) compuesta por 5xSSC, N-lauroil sarcosina 0,1%, SDS 0,02%, formamida 50% y agente bloqueante al 2% durante 2 horas a 42°C
- 2) Desechar el líquido y añadir la solución de hibridación (5 ml/100 cm²), compuesta por la solución anterior a la que se le añadió 60 ng/ml del ADN sonda desnaturalizado mediante ebullición
- 3) Incubar a 42°C durante toda la noche
- 4) Lavar el filtro 2 veces durante 5 min a temperatura ambiente con 50 ml de 2xSSC, SDS al 0,1% (p/v), seguido de 2 lavados durante 15 min a 68°C con 0,1xSSC, SDS 0,1% (p/v)
- 5) Mantener el horno de hibridación a temperatura ambiente durante el resto del proceso
- 6) Desechar la solución y lavar la membrana durante 5 min con tampón de lavado [tampón 1 (ácido málico 0,1 mol/l; NaCl 0,15 mol/l; ajustar pH a 7,5 y autoclavar) adicionado de Tween-20 0,3% (p/v)]
- 7) Incubar 30 minutos en 80 ml de tampón 2 (tampón 1 más agente bloqueante al 1%)
- 8) Diluir en 20 ml el anticuerpo anti-digoxigenina-AP, Fab fragments (ROCHE) 1:10.000 en tampón 2. Substituir por la solución anterior e incubar 30 min
- 9) Eliminar el anticuerpo no unido a la membrana mediante 2 lavados de 15 min con tampón de lavado
- 10) Equilibrar el filtro con tampón 3 (Tris-HCl 0,1 mol/l; NaCl 0,1 mol/l; MgCl₂ 50 mmol/l; pH 9,5) durante 5 min
- 11) Diluir el sustrato CSPD (ROCHE) 1:100 en 5 ml de tampón 3

- 12) Incubar durante 5 min
- 13) Desechar el tampón y eliminar el exceso de líquido de la membrana con papel Whatman 3MM
- 14) Colocar la membrana envuelta en plástico transparente en una estufa a 37°C durante 10 minutos
- 15) Exponer el filtro con películas KODAK X-OMAT y revelar a las 5 y 24 horas

Para realizar una segunda hibridación sobre la misma membrana, primero se debe eliminar la anterior sonda:

- 1) Realizar 2 lavados de 15 min en NaOH 0,2 mol/l, SDS 0,1% (p/v) a 37°C
- 2) Lavar durante 5 min con 2xSSC
- 3) Comenzar el protocolo anterior desde el paso 1

11.- PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

La preparación de células competentes de *E. coli* para su transformación con plásmidos se realizó esencialmente según la técnica descrita por Lederberg y Cohen (1974).

- 1) Partiendo de un cultivo iniciador de la cepa de *E. coli* a transformar, inocular un matraz de medio LB
- 2) Incubar en agitación a 37°C hasta D.O._{600nm} de 0,6
- 3) Dejar enfriar en hielo y centrifugar a 10.000 r.p.m. (12.000xg) durante 5 min a 4°C
- 4) Resuspender las células en un volumen igual de MgCl₂ 0,1 M frío
- 5) Centrifugar a 5.000 r.p.m. (3.000xg) durante 5 min a 4°C
- 6) Resuspender en ½ del volumen inicial de una solución de CaCl₂ 0,1 M frío
- 7) Dejar las células en hielo durante un mínimo de 30 min
- 8) Volver a centrifugar a 3.000xg durante 5min a 4°C
- 9) Resuspender suavemente en 1/10 del volumen inicial de CaCl₂ 0,1 M, 20% glicerol frío

10) Repartir en alícuotas de 200 μ l en tubos eppendorf preenfriados y congelar rápidamente en nitrógeno líquido

11) Conservar a -80°C. La competencia de las células se mantuvo de esta forma durante varios meses

12.- TRANSFERENCIA DE ADN

12.1.- Transformación

La transformación de células competentes con ADN plasmídico se basa en la técnica descrita por Rodríguez y Tait (1983).

1) Añadir el ADN (50 a 500 ng) purificado por minipreparación de plásmidos, por lisis alcalina o por el *kit* comercial "Wizard MiniprepsTM" (Promega) a alícuotas de 200 μ l de células competentes

2) Dejar la mezcla en hielo durante 30 min

3) Someter a un choque de calor de 42°C durante 2 min

4) Dejar 5 min en hielo

5) Añadir 1 ml de LB

6) Incubar a 37°C durante al menos 60 min

7) Transcurrido este tiempo sembrar alícuotas de 0,1 ml en placas de LB adicionadas de los antibióticos correspondientes

12.2.- Conjugación

Para llevar a cabo la transferencia de plásmidos no autotransmisibles que contienen el *oriT* del plásmido RK2 desde cepas no movilizadoras de *E. coli* a *Rhizobium* y *Agrobacterium* se siguió el modelo de cruce triparental, usando pRK2013 (Ditta *et al.*, 1980) como plásmido movilizador en *trans*.

1) Tomar una asa de siembra de masa bacteriana de las cepas crecidas en placa en proporción 1:1:1 de donador:movilizador:receptor (dependiendo de la mucosidad

Material y Métodos

de las bacterias, el receptor puede agregarse en mayor proporción) y mezclar sobre medio TY-agar

2) Tras un tiempo de incubación de 24 horas, sembrar la mezcla sobre placas con medio mínimo adicionadas de los antibióticos apropiados

3) Realizar dos pases en medio mínimo de colonias aisladas antes de sembrar en medio TY

12.3.- Electroporación

Para transferir ADN a las cepas de *Pseudomonas* se utilizó la técnica de electroporación, más efectiva para estas cepas que la conjugación. Se realizó en el equipo ELECTRO CELL MANIPULATOR 600, BTX Electroporation System, según el siguiente protocolo:

- 1) Tomar una asa de siembra de biomasa fresca de placa o 3 ml de cultivo líquido crecido hasta fase exponencial tardía
- 2) Recoger la masa celular en tubos eppendorf de 1,5 ml
- 3) Lavar varias veces con agua desionizada estéril
- 4) Resuspender en 40 μ l de agua desionizada estéril
- 5) Añadir 1,5 μ l del ADN (300-500 ng) obtenido mediante purificación por *kit* comercial "Wizard Minipreps™" (Promega)
- 6) Incubar la mezcla durante 1 min en hielo
- 7) Colocar la mezcla en una cubeta de electroporación preenfriada, siendo las condiciones de electroporación a 1,8 Kv
- 8) Si durante la descarga se observa la formación de un arco, desechar la alícuota y repetir con otra nueva
- 9) Después de la descarga, incubar las células en LB líquido durante una hora y media
- 10) Sembrar en LB-agar con los correspondientes antibióticos distintas alícuotas de las electroporaciones
- 11) Incubar durante 24 horas a 30°C

13.- SECUENCIACIÓN

13.1.- Obtención de cebadores y secuenciación automática

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo de Tesis fueron sintetizados mediante el sintetizador de oligonucleótidos Beckman Oligo 1000 DNA Synthetizer. Las secuencias de ADN se obtuvieron mediante el Secuenciador ABI 373 XL Stretch Termociclador PE 9600. Ambas prestaciones fueron adquiridas a través del servicio de secuenciación del Instituto de Biomedicina y Parasitología "López Neyra" (CSIC, Granada).

13.2.- Análisis informático de secuencias de ADN

Las secuencias de ADN obtenidas se analizaron mediante el programa EDITVIEW (PERKIN ELMER), para MacIntosh.

El análisis de sitios de restricción y localización de posibles ORFs, se realizó con la versión 2.5.1 de GeneWorks (Oxford Molecular Group), para MacIntosh.

La búsqueda de homologías a nivel de ADN y proteína con secuencias conocidas presentes en los bancos de datos se llevó a cabo mediante los programas FASTA y BLAST del servicio de Internet a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (Pearson y Lipman, 1988; Altschul *et al.*, 1990).

14.- ENSAYOS DE HOMING

El análisis de *homing* de RmInt1 realizado en células de *S. meliloti*, cepas 1021 y RMO17 (capítulo I), se llevó a cabo empleando dos sistemas: i) el plásmido pBB0.6+ es utilizado como receptor de copias de RmInt1 localizadas en el genoma y ii) el plásmido pKG2.5 se emplea como donador de RmInt1, siendo el plásmido receptor pJB0.6+. Los plásmidos fueron transferidos de células de *E. coli* a *S. meliloti* mediante conjugaciones triparentales (Ditta *et al.*, 1980).

Los ensayos de *homing* realizados sobre huéspedes heterólogos (capítulo IV) se basaron en un sistema de movimiento del intrón RmInt1 entre plásmidos, desde el

plásmido donador pKG2.5 al receptor pJB0.6+, resultando en el plásmido pJB2.5 si se produce *homing*. Se utilizó un segundo plásmido receptor carente de diana de inserción pJBΔ129, como control negativo de movimiento. Los plásmidos fueron transferidos mediante conjugación triparental a las cepas del orden Rhizobiales, mediante electroporación a la cepa de *Pseudomonas putida* y por transformación a *E. coli*.

En el capítulo V se realizan ensayos de *homing* sobre células de *S. meliloti* RMO17. En este caso, el análisis de movimiento entre plásmidos compatibles se realizó entre los plásmidos donadores silvestre pKG2.5 y derivados mutados, pKG2.5X, pKG2.5-YAHH, pKG2.5-ΔC29 y pKG2.5D5-CGA y el receptor pJB0.6+.

La construcción de estos plásmidos se indica al final de Materiales y Métodos (Martínez-Abarca *et al.*, 2000).

Tras realizar la transferencia de plásmidos a las cepas deseadas y obtener colonias aisladas, se extrajo el ADN plasmídico de las células cultivadas mediante minipreparación de plásmidos por lisis alcalina o el *kit* comercial "Wizard Minipreps™" (Promega). Los plásmidos se digieren con la enzima *SalI*, se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se analizan mediante hibridación de ADN, empleando sondas específicas para detectar RmInt1 (Martínez-Abarca *et al.*, 1998; 2000).

14.1.- Cuantificación de la eficiencia de *homing*

La eficiencia de *homing* se define como el porcentaje de plásmido receptor conteniendo la diana de inserción invadido por el intrón (producto de *homing*) respecto al total de plásmido receptor, según la fórmula $100(H/H+R)$, donde H es el plásmido producto de *homing* y R es el plásmido receptor. Esta eficiencia se estima mediante análisis cuantitativo de las bandas detectadas empleando la técnica de hibridación ADN-ADN, considerando la intensidad por mm² del volumen de banda. El programa utilizado para llevar a cabo la cuantificación fue Quantity One (Bio-Rad).

15.- EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

15.1.- Extracción de ARN de *Rhizobium*

Como en todos los ensayos donde se maneja ARN, las soluciones y los materiales deben estar libres de ARNasas.

- 1) Inocular una colonia crecida en TY en placa petri en 10 ml de TY líquido con kanamicina
- 2) Cultivar las células en agitación a 28°C hasta alcanzar D.O._{600nm} de 0,6
- 3) Recoger las bacterias en alícuotas de 1,5 ml en tubos eppendorf
- 4) Resuspender en 300 µl de solución I (1,4% SDS; EDTA 4 mM precalentado a 65°C; 25 µl de proteinasa K 5 mg/ml)
- 5) Incubar 10 min a 65°C, mezclando mediante vórtex cada 3-4 min
- 6) Colocar en hielo y añadir 150 µl de NaCl 5 M a 4°C
- 7) Dejar 10 min a 4°C
- 8) Centrifugar 15 min a 4°C a 14.000 r.p.m.
- 9) Pasar la fase acuosa a un nuevo tubo
- 10) Agregar 2,5 veces el volumen de etanol 100% preenfriado a -20°C
- 11) Mezclar bien y dejar precipitando a -70°C durante 1 hora
- 12) Centrifugar 30 min a 9.000 r.p.m.
- 13) Resuspender en 170 µl de agua desionizada esterilizada libre de ARNasas
- 14) Preparar en un volumen de 200 µl la solución de tratamiento de ADNasa: 170 µl del ARN aislado, 20 µl de tampón 10X (Tris-HCl 500 mM pH 7,5; MgCl₂ 10 mM) y 10 µl de ADNasa I
- 15) Incubar a 37°C durante 30 min
- 16) Añadir 200 µl de fenol:cloroformo:isoamílico, mezclando bien
- 17) Centrifugar a 10.000 r.p.m. durante 5 min
- 18) Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo y extraer con 200 µl de cloroformo
- 19) Agregar el 10% del volumen de acetato sódico 3 M pH 4,8 y 2,5 volúmenes de etanol 100%
- 20) Precipitar durante 60 min a -70°C
- 21) Centrifugar a 4°C durante 30 min a 15.000 r.p.m.
- 22) Lavar con etanol al 70%
- 23) Resuspender el ARN en 100 µl de agua desionizada esterilizada libre de ARNasas
- 24) Realizar electroforesis en gel de agarosa

15.2.- Desnaturalización con glioxal y electroforesis en gel de agarosa

Este método es una adaptación del descrito por McMaster y Carmichael (1977).

- 1) Mezclar en un tubo eppendorf 1,8 μ l de Glioxal 6 M, 5,3 μ l de dimetil sulfóxido (DMSO), 1 μ l de fosfato sódico 0,1 M pH 7 (preparar a partir de 3,9 ml de NaH_2PO_4 1 M y 6,1 ml de Na_2HPO_4 1 M en 100 ml de solución) y 1,8 μ l de ARN muestra
- 2) Incubar la mezcla a 50°C durante 60 min
- 3) Mientras se desnaturaliza el ARN, preparar el gel de agarosa al 1% en 10 mM de fosfato sódico pH 7
- 4) Pasados los 60 min, colocar el tubo con el ARN en hielo y centrifugar 5 segundos
- 5) Añadir 2 μ l de tampón de carga libre de ARNasas
- 6) Realizar la electroforesis a 3-4 V/cm de longitud, con recircularización del tampón si es posible o efectuando cambios completos de tampón cada 30 min
- 7) Enjugar el tampón sobrante del gel en papel 3MM y secar al vacío durante 60 min a 60°C en un secageles

16.- ANÁLISIS DE *SPLICING* DE RmInt1 *IN VIVO*

En el capítulo I se llevó a cabo el aislamiento de ARN total de células de *S. meliloti* 1021 y RMO17 conteniendo el plásmido pKG2.5 (Martínez-Abarca *et al.*, 2000). Tras cultivar las células en 10 ml de medio TY con kanamicina hasta alcanzar D.O._{600nm} de 0,6 se procedió al aislamiento de ARN como se describe anteriormente. El análisis de extensión de cebador se realizó mediante una técnica basada en la descrita por Marqués *et al.* (1993):

- 1) Preparar la mezcla de reacción en 10 μ l conteniendo: 5 μ g de ARN total, 10 mM de tampón PIPES pH 7,5, NaCl 400 mM y 0,2 pmoles (aproximadamente 300.000 c.p.m.) del cebador P (5'-TGAAAGCCGATCCCGGAG-3') marcado radiactivamente en el extremo 5'
- 2) Calentar la mezcla a 85°C durante 5 min

- 3) Incubar a 60°C durante 3 min y dejar enfriar lentamente hasta 44°C
- 4) Comenzar la reacción de extensión al añadir 40 µl de mezcla conteniendo: Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 60 mM, DTT 10 mM, MgOAc 6 mM, 1mM de cada uno de los cuatro dNTPs, actinomicina D (SIGMA) 60 µg/ml, 2 unidades de inhibidor de ARNasa (ROCHE) y 7 unidades de AMV-RT (ROCHE)
- 5) Incubar la reacción a 44°C durante 60 min
- 6) Parar la reacción al adicionar 5 µl de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 150 µl de etanol preenfriado

Los productos se analizaron en gel desnaturalizante (7 M urea) de poliacrilamida al 6%.

El análisis de *splicing in vivo* sobre células de RMO17 conteniendo el intrón silvestre o mutado, realizado en el capítulo V de esta Tesis, presenta algunas diferencias con el método anterior, en los siguientes puntos: la reacción se realizó a partir de 20 µg de ARN total y los productos obtenidos se analizaron en gel desnaturalizante (8 M urea) de poliacrilamida al 6%.

17.- AISLAMIENTO DE PARTÍCULAS DE RIBONUCLEO-PROTEÍNA

La obtención de partículas de ribonucleoproteína (RNPs) de RmInt1 se realizó esencialmente como describe Matsuura *et al.* (1997). Por tratarse de un complejo proteína-ARN, todos los materiales y las soluciones empleadas en este aislamiento deben ser de calidad ARN, libres de ARNasas.

- 1) Inocular una colonia de la cepa bacteriana de *Sinorhizobium* crecida en placa en 3 ml de TY, conteniendo antibiótico si es necesario
- 2) Incubar en agitación a 28°C hasta fase estacionaria
- 3) Inocular 1 ml de este precultivo en un matraz de 500 ml conteniendo 200 ml de TY con antibiótico si se requiere
- 4) Incubar a 28°C en agitación hasta fase logarítmica, D.O._{600nm} 0,6-0,9

Material y Métodos

- 5) Recoger el cultivo por centrifugación en una centrífuga Sorvall con rotor GSA a 4.000xg durante 5 min a 4°C
- 6) Resuspender el precipitado en 20 ml de N-lauroil sarcosina 0,1% (p/v) en TE preenfriado en hielo
- 7) Centrifugar en una Sorvall con rotor SS34 a 3.000xg durante 5 min a 4°C
- 8) Lavar con agua estéril desionizada a 4°C
- 9) Lavar con 20 ml de NaCl 150 mM preenfriado
- 10) Resuspender las células en 4 ml de tampón A frío (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; EDTA 1 mM; DTT 1 mM; 10% glicerol), añadiendo lisozima (ROCHE) a una concentración final de 2 mg/ml
- 11) Congelar a -70°C. Las muestras así conservadas pueden mantenerse viables durante una semana
- 12) Lisar las células mediante 3 ciclos de congelación en hielo seco y descongelación a 28°C. Se debe obtener una solución muy viscosa
- 13) Añadir 4 volúmenes de tampón HKCTD (KCl 500 mM; CaCl₂ 50 mM; Tris-HCl 25 mM pH 7,5; DTT 5 mM)
- 14) Sonicar mediante 5 pulsos a nivel 5 con una punta fina (Branson SONIFIER 250). Observar una ligera homogeneización de la muestra
- 15) Centrifugar esta solución en una Sorvall con rotor SS34 a 12.000xg durante 15 min a 4°C para precipitar las células lisadas
- 16) Verter el sobrenadante sobre 5 ml de un colchón de sacarosa 1,85 M en HKCTD, esterilizado mediante filtración
- 17) Ultracentrifugar en una Beckman con rotor Ti50 a 50.000 r.p.m. durante 17 h a 4°C
- 18) Eliminar el líquido mediante succión con pipeta pasteur con mucho cuidado de no despegar el precipitado conteniendo las RNPs
- 19) Lavar 3 veces con 1 ml de agua desionizada fría
- 20) Añadir 100-150 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8,0, DTT 1 mM y dejar resuspender durante 2 horas
- 21) Transferir a un tubo eppendorf y centrifugar a 15.000 r.p.m. durante 5 min a 4°C
- 22) Recoger el sobrenadante, desechando la parte insoluble
- 23) Congelar a -70°C

18.- SDS PAGE

18.1.- Extractos de proteínas

Los extractos de proteína analizados mediante este método consistieron en las preparaciones de partículas de ribonucleoproteína, comparando el material celular lisado (o extracto crudo) antes y después de ser purificado mediante el colchón de sacarosa. Esta técnica permite evaluar la calidad relativa de las preparaciones de partículas de ribonucleoproteína empleadas en los ensayos.

18.2.- Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes

Se realizó según la técnica descrita por Laemmli (1970), mediante el sistema de minigeles de Bio-Rad Miniprotein II. Los geles de resolución fueron de un porcentaje del 12% de acrilamida y de un grosor de 0,75 mm. El gen concentrador fue de un porcentaje del 5% de acrilamida. A continuación se indican las fórmulas para ambos geles:

Gel de resolución:

Sol. A	2,5 ml
SDS 10%	0,05 ml
Sol. B	1,25 ml
H ₂ O	1,17 ml
APS 10%	25 µl
TEMED	5 µl

La solución A consiste en una solución de acrilamida/N,N-metileno-bisacrilamida (bisacrilamida) preparada al 30:0,15 en agua destilada. Esta solución debe ser filtrada, se conserva protegida de la luz a 4°C durante un máximo de dos semanas. La solución B es una solución de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8.

Gel concentrador:

Sol. D	0,98 ml
--------	---------

Material y Métodos

SDS 10%	19 μ l
Sol. C	0,98 ml
APS 10%	16 μ l
TEMED	1 μ l

La solución D es una nueva solución de acrilamida/bisacrilamida que se preparó al 10:0,5. De igual modo que la solución A, se filtró y se almacenó protegida de la luz durante un tiempo máximo de dos semanas. La solución C es una solución de Tris-HCl 240 mM pH 6,8.

El tampón empleado para el sistema de electrodos es el siguiente: Tris 25 mM; Glicina 190 mM pH 8,3 y 0,1% SDS. El tampón de carga está compuesto por Tris-HCl 125 mM, SDS al 0,6% (p/v) pH 6,8, glicerol al 10% (p/v), 2 β -mercaptoetanol al 5% (v/v) y azul de Bromofenol al 0,02% (p/v). Las muestras se prepararon añadiendo un 25% de su volumen de tampón de carga, se desnaturalizaron mediante ebullición durante 5 min y se mantuvieron en hielo hasta el momento de su carga en el gel.

El voltaje constante empleado en la electroforesis fue de 200 V.

18.3.- Detección de proteínas en geles de poliacrilamida

La detección de proteínas se realizó mediante la tinción con azul Coomassie.

- 1) Sumergir el gel en una solución de fijación y teñido conteniendo etanol:ácido acético:agua en proporción 50:10:40, adicionada con Azul Coomassie R-250 al 0,2%
- 2) Incubar el gel durante 1 hora en agitación suave a temperatura ambiente
- 3) Decolorar mediante una solución compuesta de metanol:ácido acético:agua en proporciones 5:15:80
- 4) Conservar el gel en ácido acético al 7% o proceder a su desecación en un secageles

19.- ACTIVIDAD REVERSO TRANSCRIPTASA

Los ensayos realizados para estudiar la actividad reverso transcritasa (RT) de RmInt1 fueron llevados a cabo básicamente como describen Moran *et al.* (1995) y Matsuura *et al.* (1997).

19.1.- RT exógena

- 1) Preparar el medio de reacción conteniendo KCl 10 mM, MgCl₂ 25 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, DTT 5 mM, 1 µg de sustrato poli(rA)/oligo(dT)₁₈ o poli(rA) y 10 µCi de [α -³²P]dTTP (3.000 Ci/mmol; Amersham)
- 2) Añadir 0,040 unidades de RNPs (D.O._{260nm})
- 3) Incubar la reacción a 37°C durante 20 min
- 4) Colocar 8 µl de la reacción en papel DEAE
- 5) Dejar secar y realizar 4 lavados en 2xSSC (1xSSC: NaCl 150 mM; citrato sódico 15 mM pH 7,0)
- 6) Secar al aire y contar la radiactividad como material de alto peso molecular incorporado al papel en el contador de centelleo Cerenkov

19.2.- RT endógena

- 1) Preparar el medio de reacción conteniendo KCl 10 mM, MgCl₂ 25 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, DTT 5 mM, 200 µM de cada uno de los nucleótidos dATP, dTTP y dGTP, 20 pmoles de cebador de ADN complementario al ARN endógeno sentido o antisentido y 10 µCi de [α -³²P]dCTP (3.000 Ci/mmol; Amersham)
- 2) Añadir 0,040 unidades de RNPs (D.O._{260nm})
- 3) Realizar la reacción a 37°C durante 20 min
- 4) Colocar 8 µl de la reacción en papel DEAE
- 5) Secar y lavar 4 veces en 2xSSC
- 6) Secar al aire y contar la radiactividad incorporada al papel en el contador de centelleo Cerenkov

20.- ACTIVIDAD ENDONUCLEASA Y *SPLICING* REVERSO. PREPARACIÓN DE SUSTRATOS

Los sustratos diana de ADN de cadena doble para RmInt1 fueron preparados mediante PCR usando cebadores marcados radiactivamente en el extremo 5', para señalar independientemente la cadena sentido o antisentido del sustrato de PCR. Se realizaron diferentes protocolos de marcaje y se presentan a continuación los que proporcionaron mejores resultados.

20.1.- Marcaje de cebadores en el extremo 5' y condiciones de PCR

- 1) Preparar un volumen de reacción de 40 μ l conteniendo 40 pmoles del cebador purificado por HPLC
- 2) Añadir 32 unidades de T4 polinucleótido kinasa (New England Biolabs) y 5 μ l del tampón 10x específico
- 3) Adicionar 100 μ Ci de [γ -³²P]ATP (3.000 Ci/mmol; Amersham)
- 4) Incubar a 37°C durante 60 min
- 5) Parar la reacción con 2 μ l de EDTA 0,5 M, pH 8
- 6) Limpiar el cebador mediante una extracción con una mezcla de fenol:cloroformo (1:1), siendo el cloroformo una mezcla de isoamílico:cloroformo 1:24
- 7) Pasar la muestra por dos columnas de sephadex MicroSpin™ G-25 Columns (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) para eliminar los nucleótidos no incorporados
- 8) Usar el cebador eluyente (aprox. 40 μ l) para realizar la reacción de PCR en un volumen total de 50 μ l
- 9) Añadir al cebador la mezcla de reacción conteniendo: 10 ng de ADN molde (pGEM-t 0.6) conteniendo la secuencia diana de RmInt1, 40 pmoles del cebador no marcado radiactivamente, 0,8 μ l de dNTPs 25mM, 0,2 unidades de *Vent* polimerasa (New England Biolabs) y 5 μ l de su tampón 10x específico

La reacción se efectuó en un termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Perkin-Elmer). El programa para la amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min; 25 ciclos a 94°C durante 30 sec, 60°C (67°C para los cebadores

-31/+31) durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, seguido de una extensión final a 72°C durante 10 min.

20.2.- Marcaje de PCR internamente

Los sustratos de ADN de cadena doble empleados en los ensayos de *splicing* reverso se marcaron internamente como sigue:

- 1) Preparar un volumen de reacción de 50 μ l conteniendo 10 ng de ADN molde
- 2) Incorporar 50 pmoles de cada cebador sin marcar
- 3) Adicionar los nucleótidos no radiactivos: 200 μ M de dATP, dGTP y 200 μ M de dCTP y 30 μ M de dTTP (en caso de usar [α -³²P]dTTP) o 200 μ M de dTTP y 30 μ M de dCTP (si usamos [α -³²P]dCTP)
- 4) Añadir 50 μ Ci de [α -³²P]dTTP o [α -³²P]dCTP (3.000 Ci/mmol; Amersham)
- 5) Agregar 0,2 unidades de *Vent* polimerasa (New England Biolabs)
- 6) Llevar a cabo la reacción siguiendo el mismo programa de amplificación descrito en el anterior apartado

20.3.- Marcaje de sustrato de ADN de cadena sencilla

El sustrato de ADN de cadena sencilla de 60 mer fue marcado en el extremo 5' para realizar los experimentos de actividad endonucleasa siguiendo la técnica descrita para marcar cebadores. Este mismo sustrato fue marcado en el extremo 3' para efectuar los ensayos de *splicing* reverso, con el *kit* comercial DNA 3'-End Labeling kit de ROCHE:

- 1) Preparar un volumen total de reacción de 50 μ l con 10 pmoles de oligonucleótido
- 2) Añadir 25 μ l de tampón de marcaje (solución 1: tampón Tris cacodilato potásico pH 7,2, 2x)
- 3) Adicionar 5 μ l de solución 2 (CoCl₂ 25 mM)
- 4) Añadir 5 μ l de agua desionizada estéril
- 5) Mezclar con 50 μ Ci de [α -³²P]ddATP (3.000 Ci/mmol; Amersham)
- 6) Completar con 5 μ l de enzima terminal transferasa [solución 4: 5 unidades/ μ l de terminal transferasa en solución cacodilato potásico pH 7,2; glicerol 50% (v/v)]

- 7) Incubar a 37°C durante 60 min
- 8) Parar la reacción adicionando 5 µl de EDTA 200 mM, pH 8
- 9) Extraer con una mezcla de fenol:cloroformo:isoamílico
- 10) Purificar la muestra por 2 columnas de sephadex MicroSpin™ G-25 Columns (Amersham Pharmacia Biotech Inc.)

El sustrato de ADN de cadena sencilla de 196 mer fue marcado internamente mediante PCR asimétrica:

- 1) Realizar una PCR previa estándar con los cebadores -31/+127
- 2) Purificar el producto de PCR en gel de agarosa al 2% mediante columnas Ultrafree-DA (MILLIPORE)
- 3) Usar este producto como molde para la siguiente reacción de PCR (se debe realizar una prueba previa con distintas cantidades de molde para establecer el punto de máxima síntesis de ADN de cadena sencilla) en un volumen total de 50 µl
- 4) Añadir 200 µM de dATP, dGTP, dTTP y 30 µM de dCTP
- 5) Agregar 100 pmoles del cebador sentido
- 6) Adicionar 50 µCi de [α -³²P]dCTP
- 7) Añadir 0,2 unidades de *Vent* polimerasa (NEB)
- 8) Realizar la reacción a 57°C con el mismo programa empleado para la PCR estándar

20.4.- Purificación de sustratos

Todos los sustratos marcados radiactivamente fueron purificados en gel no desnaturante de poliacrilamida al 6%:

- 1) Una vez terminada la electroforesis, quitar el cristal de un lado del gel y cubrirlo con film transparente
- 2) Colocar señaladores fosforescentes a ambos lados del gel
- 3) Realizar una exposición corta en película
- 4) Recortar con un bisturí la marca del sustrato sobreimpresionada
- 5) Colocar la película sobre el gel haciendo coincidir los señaladores
- 6) Cortar la banda del gel correspondiente al sustrato

- 7) Incubar durante toda la noche en 300 μ l de tampón Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, acetato amónico 0,5 mM a 37°C
- 8) Extraer con fenol:cloroformo:isoamílico
- 9) Precipitar con etanol 100%, 0,2% acrilamida lineal (Bio-Rad), acetato amónico 5 mM
- 10) Dejar secar, contar cuentas por minuto y resuspender en agua

21.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD ADN ENDONUCLEASA Y *SPLICING* REVERSO

Los ensayos de actividad ADN endonucleasa y *splicing* reverso fueron llevados a cabo según el siguiente procedimiento:

- 1) Preparar un volumen de reacción de 10 μ l conteniendo KCl 10 mM, MgCl₂ 25 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5 y DTT 5 mM
- 2) Añadir 150.000-370.000 c.p.m. del sustrato de ADN marcado
- 3) Comenzar la reacción añadiendo 0,080-0,200 unidades de RNPs (D.O._{260nm})
- 4) Incubar 20 min a 37°C
- 5) Parar la reacción añadiendo 40 μ l TE, 0,2% acrilamida lineal, 0,3 M acetato sódico pH 5,2
- 6) Extraer los productos de reacción con fenol:cloroformo:isoamílico
- 7) Precipitar con etanol
- 8) Dejar secar y resuspender en 8 μ l TE-tampón de carga (Azul de Bromofenol 0,3%; Xilen Cianol 0,3%; EDTA 10 mM pH 7,5 y formamida desionizada 97,5%)

Los productos fueron analizados mediante electroforesis en gel desnaturante (8 M urea) de poliacrilamida al 3,5% (*splicing* reverso) y al 6,5% (ADN endonucleasa), en paralelo con escalera de secuenciación o marcadores de peso molecular. La escalera fue generada a partir del molde pGEM-t 0.6 con el cebador correspondiente al extremo 5' del sustrato, marcada internamente usando el *kit* comercial T7 Sequencing Kit (USB). En el caso de *splicing* reverso, el análisis de los productos de reacción se realizó también mediante desnaturación con glioxal y electroforesis en gel de agarosa al 1%.

El gel fue secado y autorradiografiado en película o mediante Molecular Dynamics Imager. El análisis y tratamiento de imágenes, así como la cuantificación de los productos de *splicing* reverso se realizaron con el programa Quantity One (Bio-Rad).

21.1.- Marcaje de marcador de peso molecular

El marcaje de marcadores de peso molecular de ADN se realizó usando el siguiente protocolo:

- 1) Preparar un volumen de reacción de 10 μ l conteniendo 0,25 μ g de marcador
- 2) Añadir 10 unidades de T4 polinucleótido kinasa (New England Biolabs) y 1 μ l del tampón 10x específico
- 3) Adicionar 20 μ Ci de [γ - 32 P]ATP (3.000 Ci/mmol; Amersham)
- 4) Incubar a 37°C durante 60 min
- 5) Calentar la reacción a 70°C durante 10 min
- 6) Purificar la muestra por una columna sephadex MicroSpin™ G-25 Columns (Amersham Pharmacia Biotech Inc.)
- 7) Preparar una dilución del marcador para usar en cada gel aproximadamente 150.000 c.p.m.

21.2.- Escalera de secuenciación

Este protocolo está basado en el *kit* comercial T7 Sequencing Kit de USB.

- 1) Desnaturalizar 1,5-2 μ g de ADN (pGEM-t 0.6) en un volumen de 40 μ l conteniendo 8 μ l de NaOH 2 M, incubando 10 min a temperatura ambiente
- 2) Añadir 7 μ l de acetato sódico 3 M pH 4,8 y 4 μ l de agua desionizada
- 3) Agregar 120 μ l de etanol 100%
- 4) Dejar precipitando a -70°C durante 15 min
- 5) Centrifugar 15 min
- 6) Lavar con etanol al 70% y secar
- 7) Preparar la mezcla de anillamiento en un volumen de 14 μ l, conteniendo el ADN desnaturalizado en 10 μ l, 2 μ l de tampón de anillamiento (Tris-HCl 1 M pH 7,5;

MgCl₂ 100 mM y DTT 160 mM) y 10 pmoles de cebador (el mismo utilizado como extremo 5' para la síntesis de los sustratos por PCR)

8) Calentar la mezcla 5 min a 65°C

9) Incubar 10 min a 37°C

10) Dejar a temperatura ambiente 5 min antes de comenzar la reacción de secuenciación

11) Preparar los tubos de secuenciación con las mezclas A, C, G y T (contienen 93,5 µM del dNTP nombrado; 840 µM de los otros 3 dNTPs; 14 µM de ddNTP designado; 40 mM Tris-HCl pH 7,5 y 50 mM de NaCl) con 2,5 µl cada uno y preincubar a 37°C

12) Añadir al ADN anillado con el cebador 3 µl de mezcla de reacción de marcaje (dATP, dGTP y dTTP 1,375 µM y 333,5 mM de NaCl), 5 µCi de [α -³²P]dCTP (3.000 Ci/mmol; Amersham) y 2 µl de enzima T7 ADN polimerasa diluida en su tampón de dilución

13) Dejar la mezcla incubando a temperatura ambiente durante 5 min

14) Añadir 4,5 µl de esta mezcla a cada uno de los cuatro tubos de secuenciación

15) Incubar 5 min más a 37°C

16) Añadir 5 µl de solución Stop (Azul de Bromofenol 0,3%; Xilen Cianol 0,3%; EDTA 10 mM pH 7,5 y formamida desionizada 97,5%)

17) Emplear 3 µl de cada nucleótido para el gel de secuenciación

21.3.- Tratamientos enzimáticos

En determinados ensayos de *splicing* reverso se realizaron tratamientos enzimáticos, tanto de las RNPs como de los productos de reacción obtenidos, para determinar la naturaleza de los mismos. Los tratamientos se realizaron a 37°C durante 15 minutos.

En los ensayos en los que se empleó sólo ARNasa A (ROCHE), se añadió 1 µg a la muestra y se procedió a la incubación.

En los ensayos con varias digestiones, las enzimas se añadieron como sigue: ARNasa A (ROCHE), 0,4 µg; ARNasa T1 (ROCHE), 0,5 unidades.

