

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología



CARACTERIZACIÓN A NIVEL GENÉTICO Y MOLECULAR
DE LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINA POR
Rhizobium leguminosarum bv. *viciae* CEPA Z25

Laura Mora de Zayas

TESIS DOCTORAL

2005

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología

CARACTERIZACIÓN A NIVEL GENÉTICO Y MOLECULAR
DE LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINA POR
Rhizobium leguminosarum bv. *viciae* CEPA Z25

Memoria que presenta la Licenciada en Farmacia Dña. Laura Mora de Zayas
para aspirar al grado de Doctor

Fdo. Dña. Laura Mora de Zayas

V°B° El Director

V°B° El Director

Fdo. Dr. Jesús Juan González López
Catedrático de Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada

Fdo. Dra. M^a Belén Rodelas González
Investigadora del programa Ramón y Cajal
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada

Granada, 2005

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada dentro del grupo de investigación “Microbiología Ambiental” (Ref. PAI: RNM-270) y subvencionada por el Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (Ministerio de Educación y Ciencia).

A mis padres, Carmen y Gerardo

A mi hermano Gerardo

A mis abuelos

A Paco

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades del género <i>Rhizobium</i>	3
1.1.1. Fijación biológica de nitrógeno en el género <i>Rhizobium</i> y simbiosis con leguminosas	3
1.1.2. Familia <i>Rhizobiaceae</i>	4
1.1.2.1. Introducción	4
1.1.2.2. Historia	5
1.1.2.3. Taxonomía de la familia <i>Rhizobiaceae</i>	6
1.1.2.4. Género <i>Rhizobium</i>	11
1.1.3. Distribución ecológica de los rizobios	13
1.1.4. Especificidad de la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa y factores que la controlan	14
1.1.5. El problema de la competición entre cepas del género <i>Rhizobium</i>	20
1.2. Bacteriocinas	27
1.2.1. Definición de bacteriocina	27
1.2.2. Clasificación de las bacteriocinas de <i>Rhizobium</i>	28
1.2.3. Bacteriocinas de tipo pequeño (<i>small</i>)	31
1.2.3.1. Acil-homoserina lactonas	31
1.2.3.2. Trifolitoxina	39
1.2.4. Bacteriocinas de tipo medio (<i>medium</i>): toxinas RTX	41
1.2.4.1. Toxinas RTX	41
1.2.4.2. Estructura genética	44
1.2.4.3. RtxC	45
1.2.4.4. Proteínas transportadoras de toxinas RTX	47
1.2.4.5. Repeticiones de las proteínas RtxA	53
1.2.4.6. Detalles estructurales de las proteínas RtxA	56
1.2.4.7. Toxinas RTX en <i>Rhizobium leguminosarum</i>	60
1.3. Toxinas RTX y regulación	67
1.3.1. Hemolisina HlyA de <i>Escherichia coli</i>	67
1.3.1.1. Regulación de <i>hly</i> por RfaH y <i>ops</i>	68
1.3.1.2. Regulación de <i>hly</i> por H-NS y Hha	70
1.3.2. Leucotoxina LktA de <i>Mannheimia haemolytica</i>	81
1.3.3. Leucotoxina LtxA de <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	84

1.3.4. Toxinas RTX de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	91
2. OBJETIVOS	97
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	103
3.1. Técnicas microbiológicas y bioquímicas	105
3.1.1. Cepas bacterianas y plásmidos	105
3.1.2. Medios de cultivo	114
3.1.3. Antibióticos	116
3.1.4. Conservación de cepas bacterianas	116
3.1.5. Mantenimiento de cepas bacterianas.....	117
3.1.6. Ensayo de competición en medio líquido	117
3.2. Técnicas de biología molecular	118
3.2.1. Obtención de ADN plasmídico a partir de cultivos de <i>Escherichia coli</i>	118
3.2.2. Obtención de ADN total de <i>Rhizobium</i>	119
3.2.3. Determinación de la concentración de ADN.....	121
3.2.4. Digestión total de ADN con enzimas de restricción	121
3.2.5. Extracción de ADN con fenol-cloroformo.....	122
3.2.6. Electroforesis.....	122
3.2.6.1. Electroforesis de fragmentos de restricción de ADN, revelado de geles, fotografía y estimación del tamaño molecular de dichos fragmentos.....	122
3.2.6.2. Electroforesis para detección de plásmidos y megaplásmidos en sistema horizontal por el método “Back trap”	124
3.2.7. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	125
3.2.8. Ligación en vectores de clonación de fragmentos de ADN.....	127
3.2.8.1. Ligación en vectores de clonación	127
3.2.8.2. Generación de extremos romos a partir de extremos cohesivos	127
3.2.8.3. Defosforilación de ADN lineal	128
3.2.9. Transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	129
3.2.9.1. Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> con RbCl	129
3.2.9.2. Transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	130
3.2.10. Mutagénesis al azar de <i>Rhizobium</i> con el transposón Tn5.....	131
3.2.11. Screening para la detección de la producción de bacteriocinas en <i>Rhizobium</i> ..	132
3.2.12. Hibridación ADN-ADN	134
3.2.12.1. Transferencia de ADN a membranas de nylon (<i>Southern blot</i>).....	134
3.2.12.2. Marcaje de sondas con digoxigenina	135

3.2.12.3. Hibridación ADN-ADN con sondas no radiactivas.....	136
3.2.13. Transferencia de ADN a cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> mediante conjugación triparental.....	138
3.2.14. Recombinación doble en <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	138
3.2.15. Amplificación de ADN por PCR (reacción en cadena de la polimerasa).....	141
3.2.16. Amplificación de ADN por PCR inversa	143
3.2.17. Secuenciación de ADN.....	146
3.2.18. Tratamiento y análisis de las secuencias.....	146
3.2.19. Determinación del sitio de inicio de la transcripción mediante la reacción de extensión del cebador (<i>primer extension</i>).....	149
3.2.19.1. Extracción del ARN total.....	149
3.2.19.2. Diseño y marcaje del cebador.....	150
3.2.19.3. Hibridación y extensión reversa a partir del cebador	151
3.2.19.4. Reacción de secuenciación	152
3.3. Ensayos con plantas	153
3.3.1. Inoculación de plantas de guisante (<i>Pisum sativum</i> cv. Frisson) con cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	153
3.3.1.1. Desinfección y pregerminación de las semillas.....	153
3.3.1.2. Solución nutritiva para el cultivo de las plantas	154
3.3.1.3. Siembra de las plántulas, inoculación y crecimiento.....	154
3.3.2. Ensayo de nodulación	156
3.3.3. Ensayo de competición por la nodulación	156
3.4. Técnicas analíticas	157
3.4.1. Determinación de la actividad β -galactosidasa.....	157
3.4.1.1. Actividad β -galactosidasa en <i>Rhizobium leguminosarum</i>	158
3.4.1.2. Actividad β -galactosidasa en <i>Escherichia coli</i>	159
3.4.2. Ensayo de actividad reductora de acetileno (ARA) de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> en nódulos de guisante	159
3.5. AHLs	161
3.5.1. Ensayo en placa para la detección de AHLs.....	161
3.5.1.1. Ensayo en placa con <i>Chromobacterium violaceum</i> cepa CV026.....	161
3.5.1.2. Ensayo en placa con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4 pZLR4	162
3.5.2. Extracción de AHLs.....	163
3.5.3. Análisis de los extractos de AHLs por cromatografía en capa fina.....	164
3.5.3.1. Cromatografía en capa fina.....	164
3.5.3.2. Detección de las AHLs en la placa de cromatografía en capa fina	164

4. RESULTADOS.....	167
4.1. Obtención de cepas mutantes derivadas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> cepa Z25 no productoras de rizobiocina. Clonación y secuenciación del locus/loci codificante de la producción de rizobiocina en el genoma de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> cepa Z25.....	169
4.1.1. Mutagénesis al azar	169
4.1.2. <i>Screening</i> de las cepas mutantes para la detección de fenotipos Bac ⁻	169
4.1.3. Perfil de plásmidos nativos de la cepa Z25 e hibridación de los plásmidos de las cepas mutantes con una sonda de Tn5	171
4.1.4. Mapeo de las inserciones del transposón Tn5 que producen los fenotipos Bac ⁻	173
4.1.5. Clonación de fragmentos de la región donde se produjeron las inserciones, subclonación y posterior secuenciación	175
4.2. Análisis predictivo de la región secuenciada.....	183
4.2.1. Análisis predictivo de la secuencia y caracterización de los posibles marcos abiertos de lectura.....	183
4.2.2. Análisis predictivo de las proteínas de la región responsable de la expresión de la bacteriocina	209
4.2.2.1. Análisis de la transposasa.....	210
4.2.2.2. Análisis de la integrasa.....	212
4.2.2.3. Análisis del ORF3	215
4.2.2.4. Análisis de RzcC	217
4.2.2.5. Análisis de RzcA	219
4.2.2.6. Análisis de RzcD	228
4.2.2.7. Análisis de RzcE	232
4.2.2.8. Análisis de RzcF.....	235
4.3. Análisis de la región promotora de los genes <i>rzcC</i> y <i>rzcA</i>.....	239
4.3.1. Identificación del inicio de transcripción del gen <i>rzcC</i>	239
4.3.2. Identificación del inicio de transcripción del gen <i>rzcA</i>	241
4.4. Estudio de la producción de acil homoserina lactonas por <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> cepa Z25.....	243
4.4.1. Ensayo en placa con <i>Chromobacterium violaceum</i> cepa CV026	243
4.4.2. Ensayo en placa con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4 pZLR4	244
4.5. Clonación y secuenciación de los genes <i>cinRI</i>, y construcción de una mutante de la cepa Z25 en el gen <i>cinI</i>.....	245
4.5.1. Amplificación de los genes <i>cinRI</i>	245
4.5.2. Clonación y secuenciación de los genes <i>cinRI</i>	246
4.5.3. Estudio predictivo de los genes <i>cinRI</i>	246
4.5.4. Construcción de la mutante Z25- <i>cinI</i>	255
4.5.5. Comprobación de la mutante Z25- <i>cinI</i>	256

4.6. Estudio de la producción de acil homoserina lactonas por la cepa Z25 y la mutante Z25-<i>cinI</i>	259
4.6.1. Ensayo en placa para la detección de AHLs con <i>Chromobacterium violaceum</i> cepa CV026 y <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4 pZLR4 como cepas indicadoras....	259
4.6.2. Análisis de extractos de AHLs mediante cromatografía en capa fina	260
4.6.3. Ensayo de producción de bacteriocinas por la cepa Z25- <i>cinI</i>	262
4.7. Estudio de la Actividad β-galactosidasa de fusiones transcripcionales de los genes <i>rzcC</i>, <i>rzcA</i>, <i>rzcD</i> y ORF3 con el gen <i>lacZ</i>	263
4.7.1. Construcción de fusiones transcripcionales de los genes <i>rzcC</i> , <i>rzcA</i> , <i>rzcD</i> y ORF3 con el gen <i>lacZ</i>	263
4.7.1.1. Construcción de dos fusiones transcripcionales <i>rzcC-lacZ</i> (pMAGR20 y pMAGR29)	265
4.7.1.2. Construcción de tres fusiones transcripcionales <i>rzcA-lacZ</i> (pMAGR21, pMAGR17 y pMAGR16)	265
4.7.1.3. Construcción de una fusión transcripcional ORF3- <i>lacZ</i> (pMAGR22).....	266
4.7.1.4. Construcción de una fusión transcripcional <i>rzcD-lacZ</i> (pMAGR57).....	266
4.7.2. Actividad β -galactosidasa de las fusiones <i>rzcC-lacZ</i> , <i>rzcA-lacZ</i> , ORF3- <i>lacZ</i> y <i>rzcD-lacZ</i> en la cepa Z25 de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	266
4.7.3. Construcción de fusiones transcripcionales de los genes <i>rzcC</i> y <i>rzcA</i> con el gen <i>lacZ</i>	270
4.7.3.1. Construcción de fusiones transcripcionales <i>rzcC-lacZ</i> (pMAGR37, pMAGR55, pMAGR50, pMAGR52, pMAGR54 y pMAGR59)	270
4.7.3.2. Construcción de la fusión transcripcional <i>rzcA-lacZ</i> pMAGR43	271
4.7.4. Actividad β -galactosidasa de las fusiones <i>rzcC-lacZ</i> (pMAGR37, pMAGR55, pMAGR50, pMAGR52, pMAGR54 y pMAGR59) y <i>rzcA-lacZ</i> (pMAGR43) en la cepa Z25 de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	272
4.7.5. Actividad β -galactosidasa de las fusiones <i>rzcC-lacZ</i> , <i>rzcA-lacZ</i> , ORF3- <i>lacZ</i> y <i>rzcD-lacZ</i> en la cepa Z25- <i>cinI</i> de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	276
4.7.6. Actividad β -galactosidasa de las fusiones <i>rzcC-lacZ</i> , <i>rzcA-lacZ</i> , ORF3- <i>lacZ</i> y <i>rzcD-lacZ</i> en la cepa DH5 α de <i>Escherichia coli</i>	278
4.8. Construcción de las mutantes Z25-<i>rzcC</i>, Z25-ORF3⁻, Z25-ΔpORF3 y Z25-ΔpORF3::Gm	283
4.8.1. Construcción de las cepas mutantes Z25- <i>rzcC</i> y Z25-ORF3 ⁻	283
4.8.1.1. Construcción de la cepa mutante Z25- <i>rzcC</i>	283
4.8.1.2. Construcción de la cepa mutante Z25-ORF3 ⁻	284
4.8.1.3. Comprobación de las mutantes Z25- <i>rzcC</i> y Z25-ORF3 ⁻	285
4.8.2. Construcción de las mutantes Z25- Δ pORF3::Gm y Z25- Δ pORF3.....	287
4.8.2.1. Construcción de la mutante Z25- Δ pORF3::Gm	287
4.8.2.2. Comprobación de las mutantes Z25- Δ pORF3::Gm	288
4.8.2.3. Construcción de la mutante Z25- Δ pORF3	289

4.8.2.4. Comprobación de la mutante Z25- Δ pORF3	289
4.9. Estudio de la producción de bacteriocina en medio sólido.....	293
4.10. Ensayo de competición en medio líquido entre las cepas Z25, 4420, Z25-ΔpORF3 y Z25-<i>cinI</i> y la cepa sensible a la bacteriocina M17	295
4.11. Ensayos con plantas	297
4.11.1. Ensayos de nodulación	297
4.11.2. Ensayos de competición por la nodulación	301
4.12. Actividad β-galactosidasa de las fusiones en células de <i>Escherichia coli</i> mutantes en el gen <i>hns</i>	303
5. DISCUSIÓN.....	305
6. CONCLUSIONES.....	327
7. BIBLIOGRAFÍA.....	331

Δ	delección
aa	aminoácido
ADN	ácido desoxirribonucleico
AHLs	acil homoserina lactonas
Ap	ampicilina
ARA	actividad reductora de acetileno
ARN	ácido ribonucleico
c.s.p.	cantidad suficiente para
Cm	cloramfenicol
DEPC	dietilpirocarbonato
DMSO	dimetil sulfóxido
dNTPs	desoxirribonucleótidos
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido [etilenebis(oxonitrilo)]tetraacético
Gm	gentamicina
IPTG	1-isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
kb	kilobase
kDa	kilodalton
Km	kanamicina
MDa	megadalton
ONPG	<i>orto</i> -nitrofenil-β-D-galactopiranosido
ORF	<i>open reading frame</i> o marco abierto de lectura
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PSN	peso seco de nódulos
r	resistente
s	sensible
Sm	estreptomina
Sp	espectinomicina
TAE	tampón Tris-Acetato-EDTA
TBE	tampón Tris-Borato-EDTA
Tc	tetraciclina
TE	Tris-EDTA pH 8,0
TEMED	tetrametilendiamina
Tp	trimetoprim
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UFC	unidades formadoras de colonias
UV	ultravioleta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

- Tabla 1.1: Géneros y especies de la familia *Rhizobiaceae* según van Berkum y Eardly (1998). **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 1.2: Clasificación taxonómica de la familia *Rhizobiaceae* según el *Taxonomic Outline of the Prokaryotic Genera* de abril de 2001 **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 1.3: Nomenclatura actualizada de los géneros de la Tabla 1.1 según la lista *Bacterial Nomenclature Up-To-Date* de enero de 2005 compilada por DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*)..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 1.4: Producción de AHLs en *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 1.5: Ejemplos de toxinas RTX, especies bacterianas que las producen y organización genética **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 1.6: Cepas de *Rhizobium leguminosarum* productoras de bacteriocinas de tipo medio. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 1.7: Bacteriocinas secuenciadas o parcialmente secuenciadas que muestran homología con toxinas RTX **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 1.8: Familia de proteínas Hha/YmoA. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 3.1: Cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Azospirillum brasilense*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Chromobacterium violaceum* y *Escherichia coli* empleadas en este estudio. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 3.2: Plásmidos empleados. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 3.3: Concentración en µg/mL de los antibióticos empleados para las cepas de *Rhizobium leguminosarum* y *Escherichia coli* respectivamente. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 3.4: Oligonucleótidos empleados en la PCR inversa. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 3.5: Direcciones *web* de los diferentes programas empleados...**¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.1: Mutantes de la cepa Z25 con fenotipo Bac⁻ y Bac reducido. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.2: Posibles ORFs encontrados..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.3: Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos del ORF1 con otras secuencias de proteínas depositadas en bases de datos..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.4: Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos del ORF2 con otras secuencias de proteínas depositadas en bases de datos..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.5: Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos del ORF3 con otras secuencias de proteínas depositadas en bases de datos..... **¡Error! Marcador no definido.**

- Tabla 4.6: Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos del ORF4 con otras secuencias de proteínas depositadas en bases de datos. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.7: Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos del ORF5 con otras secuencias de proteínas depositadas en bases de datos. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.8: Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos del ORF6 con otras secuencias de proteínas depositadas en bases de datos. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.9: Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos del ORF7 con otras secuencias de proteínas depositadas en bases de datos. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.10: Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos del ORF8 con otras secuencias de proteínas depositadas en bases de datos. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.11: Número de aminoácidos (aa) totales y de aminoácidos básicos (K, R), ácidos (D, E), hidrofóbicos (A, I, L, F, W, V) y polares (N, C, Q, S, T, Y).. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.12: Peso molecular, punto isoelectrico y carga a pH 7..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.13: Principales dominios conservados encontrados en el ORF2. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.14: Repeticiones encontradas con el programa Radar en el ORF2. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.15: Dominios conservados encontrados en el ORF4..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.16: Dominios conservados encontrados en el ORF5..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.17: Dominios conservados encontrados en el ORF6..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.18: Repeticiones encontradas con el programa Radar en el ORF6. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.19: Dominios conservados encontrados en el ORF7..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.20: Repeticiones encontradas en el ORF7 con el programa Radar. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.21: Dominios conservados encontrados en el ORF8..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.22: Repeticiones encontradas en el ORF8 con el programa Radar. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.23: Posibles ORFs encontrados **¡Error! Marcador no definido.**

- Tabla 4.24: Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos del ORF1 con otras secuencias de proteínas depositadas en bases de datos..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.25: Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos del ORF2 con otras secuencias de proteínas depositadas en bases de datos..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.26: Número de aminoácidos (aa) totales y de aminoácidos básicos (K, R), ácidos (D, E), hidrofóbicos (A, I, L, F, W, V) y polares (N, C, Q, S, T, Y) .. **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.27: Peso molecular, punto isoelectrico y carga a pH 7 **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.28: Dominios conservados encontrados en el ORF1 **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.29: Dominios conservados encontrados en el ORF2 **¡Error! Marcador no definido.**
- Tabla 4.30: Actividad β -galactosidasa de las fusiones *rzcC-lacZ* de pMAGR59, pMAGR54, pMAGR52 y pMAGR50 en células de la cepa Z25 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* a las 24 horas..... **¡Error! Marcador no definido.**

- Figura 1.1: Nódulos en una raíz **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 1.2: Imagen de *Rhizobium leguminosarum*..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 1.3: Esqueleto de los factores Nod y sustituyentes..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 1.4: Factores que pueden influenciar la competición entre cepas de *Rhizobium* por la nodulación de las leguminosas..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 1.5: Estructura de la *N*-(3*R*-hidroxi-7-*cis*-tetradecanoil)-*L*-homoserina lactona (3-OH-C_{14:1}-HSL). **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 1.6: Cascada de regulación por *quorum sensing* en *R. leguminosarum* bv. *viciae* **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 1.7: Organización genética y estructura de las toxinas RTX....**¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 1.8: 1 Modelo del sistema de transporte de tipo I..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 1.9: Hélice β paralela. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 1.10: Mecanismo propuesto para la ruptura dependiente de calcio de un enlace Asp-Pro de FrpC y la formación de un enlace covalente Asp-Lys.. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 1.11: Segundo motivo repetido encontrado en la cepa 248 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 1.12: Mecanismo de acción de H-NS.. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 1.13: Modelo de la represión del operón *bgl* por H-NS a dos niveles..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 1.14: Estructura de la proteína H-NS de *Escherichia coli*.. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 1.15: Efecto de las concentraciones crecientes de las proteínas Hha y H-NS en la movilidad electroforética de los fragmentos de ADN de la zona reguladora del operón *hly*..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 1.16: Estructura de la región promotora *lkt*. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 1.17: Representación esquemática del operón *ltx* y secuencias en 5' de *A. actinomycetemcomitans* cepas 652 e IS1. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 1.18: Estructura de los promotores *ltx* de las cepas 652 y JP2 de *A. actinomycetemcomitans*. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 3.1: Mapa de los plásmidos derivados de pBluescript II KS (-) y pGEM®-T (pMAGR40) construidos en este trabajo..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 3.2: Mapa de los plásmidos derivados de pMP220 construidos en este trabajo..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.1: *Screening* para la detección de la producción de bacteriocinas..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.2: Gel de megaplásmidos de la cepa Z25. **¡Error! Marcador no definido.**

- Figura 4.3: Gel de megaplásmidos de la cepa Z25 y mutantes e hibridación con la sonda de Tn5 **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.4: Mapa de la región responsable de la expresión de la bacteriocina con las inserciones de Tn5. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.5: Electroforesis de las digestiones del ADN de la cepa Z25 con *EcoRI* (control negativo) y del ADN de sus mutantes con las enzimas 174
- Figura 4.6: Electroforesis de digestiones de ADN genómico de la cepa Z25 con distintas enzimas e hibridación con una sonda de 0,7 kb de la región de la bacteriocina.... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.7: Mapa de la región responsable de la expresión de la bacteriocina en el que se puede ver la sonda empleada en la hibridación que dio la información necesaria para clonar la banda *SacI* adyacente a la banda *EcoRI*..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.9: Estrategia de amplificación de la banda *SacI/EcoRI* por PCR inversa **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.10: Electroforesis de los productos amplificados en la primera PCR con los cebadores PRI1 y PRI2 y de los productos amplificados en la segunda PCR con los cebadores PRI3 y PRI4 **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.11: Secuencia de nucleótidos de la región responsable de la expresión de bacteriocina en *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* cepa Z25. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.12: Secuencias palindrómicas imperfectas encontradas en la región que se encuentra en 5' con respecto al gen *rzcC* **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.13: Alineamiento del ORF1. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.14: Secuencia del ORF1 **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.15: Estructura secundaria consenso del ORF1. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.16: Alineamiento del ORF2. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.17: Estructura secundaria consenso del ORF2. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.18: Alineamiento del ORF3. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.19: Estructura secundaria consenso del ORF3. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.20: Secuencia de la proteína ORF3. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.21: Alineamiento del ORF4. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.22: Estructura secundaria consenso del ORF4. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.23: Alineamiento parcial del ORF5..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.24: Secuencia de la proteína ORF5 **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.25: Estructura secundaria consenso del ORF5. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.26: Alineamiento del ORF6 **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.27: Estructura secundaria consenso del ORF6. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.28: Alineamiento del ORF7 **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.29: Estructura secundaria consenso del ORF7. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.30: Alineamiento del ORF8. **¡Error! Marcador no definido.**

- Figura 4.31: Estructura secundaria consenso del ORF8. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.32: Análisis de la región promotora del gen *rzcC* mediante reacción de extensión de cebador **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.33: Análisis de la región promotora del gen *rzcA* mediante reacción de extensión de cebador. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.34: Ensayo de detección de AHLs en placa con *Chromobacterium violaceum* cepa CV026. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.35: Ensayo en placa para la detección de AHLs con *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 pZLR4 como cepa indicadora.. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.36: Secuencia de nucleótidos de los genes *cinRI* amplificados por PCR en *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* cepa Z25..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.37: Alineamiento del ORF1 **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.38: Estructura secundaria consenso del ORF1 **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.39: Alineamiento del ORF2 **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.40: Estructura secundaria consenso del ORF2. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.41: Estrategia para la construcción de una cepa mutante en el gen *cinI*. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.42: A: Ensayo en placa para la detección de AHLs con *Chromobacterium violaceum* CV026 como cepa indicadora. B: Ensayo en placa para la detección de AHLs con *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 pZLR4 como cepa indicadora. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.43: Perfil de AHLs obtenido por cromatografía en capa fina de extractos del sobrenadante de cultivos de 24 horas de la cepa Z25 y de la mutante Z25-*cinI* **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.44: Ensayo de producción de bacteriocina por las cepas Z25 y Z25-*cinI*. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.45: Zona de la región promotora de los genes *rzcC* y *rzcA* que guarda identidad con el elemento regulador *hlyR* del operón *hly* de *Escherichia coli*. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.46: Actividad β -galactosidasa de las fusiones *rzcC-lacZ* de los plásmidos pMAGR20 y pMAGR29 (A) y de las fusiones *rzcA-lacZ* de los plásmidos pMAGR17, pMAGR21 y pMAGR16 (B) en células de la cepa Z25 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.47: Actividad β -galactosidasa de la fusión ORF3-*lacZ* del plásmido pMAGR22 (A) y de la fusión *rzcD-lacZ* del plásmido pMAGR57 (B) en células de la cepa Z25 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.48: Actividad β -galactosidasa de las fusiones *rzcC-lacZ* de los plásmidos pMAGR37 (A) y pMAGR55 (B) en células de la cepa Z25 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* **¡Error! Marcador no definido.**

- Figura 4.49: Actividad β -galactosidasa de la fusión *rzcA-lacZ* del plásmido pMAGR43 en células de la cepa Z25 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. ... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.50: Actividad β -galactosidasa de las fusiones *rzcC-lacZ* de los plásmidos pMAGR20, pMAGR37, pMAGR55 y pMAGR29 (A) y de las fusiones *rzcA-lacZ* de los plásmidos pMAGR17, pMAGR43, pMAGR21 y pMAGR16 (B) en células de la cepa Z25-*cinI* de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.51: Actividad β -galactosidasa de la fusión ORF3-*lacZ* del plásmido pMAGR22 en células de la cepa Z25-*cinI* de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.52: Actividad β -galactosidasa de las fusiones *rzcC-lacZ* de los plásmidos pMAGR20, pMAGR37, pMAGR55 y pMAGR29 (A) y de las fusiones *rzcA-lacZ* de los plásmidos pMAGR17, pMAGR43, pMAGR21 y pMAGR16 (B) en células de la cepa DH5 α de *Escherichia coli*. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.53: Actividad β -galactosidasa de la fusión ORF3-*lacZ* del plásmido pMAGR22 en células de la cepa DH5 α de *Escherichia coli*. ... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.54: Estrategia para la construcción de dos cepas mutantes en los genes *rzcC* y ORF3 **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.55: Estrategia para la construcción de las mutantes Z25- Δ pORF3::Gm y Z25- Δ pORF3 **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.56: Producción de bacteriocinas en medio sólido por las cepas Z25, 4420, Z25-*rzcC*, Z25-ORF3⁻, Z25- Δ pORF3::Gm, Z25- Δ pORF3 y Z25-*cinI*. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.57: Ensayo de competición en medio líquido entre las cepas Z25 y sus derivadas (4420, Z25- Δ pORF3 y Z25-*cinI*) y la cepa M17 Sp^r. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.58: Cinética de nodulación de plantas de guisante por las cepas Z25, 4420, Z25-*cinI* y Z25- Δ pORF3 **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.59: Actividad reductora de acetileno específica (nmol etileno/mg peso seco nodular·h) (A) y actividad reductora de acetileno por planta (nmol etileno/planta·h) (B) en plantas de *Pisum sativum* cv. Frisson inoculadas con las cepas Z25, 4420, Z25-*cinI* y Z25- Δ pORF3 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.60: Pesos secos (g/planta) de la parte aérea y raíz (A) y de los nódulos (B) de plantas de guisante (*Pisum sativum* cv. Frisson) inoculadas con las cepas Z25, 4420, Z25-*cinI* y Z25- Δ pORF3 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*; **¡Error! Marcador no definido.**

- Figura 4.61: Ensayo de competición por la nodulación de plantas de guisante (*Pisum sativum* cv. Frisson) entre la cepa Z25 y sus derivadas (4420, Z25-*cinI* y Z25- Δ pORF3) y la cepa M17 Sp^r. **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 4.62: Actividad β -galactosidasa de la fusión *rzcC-lacZ* del plásmido pMAGR29 en células de las cepas TP2101 y BE1522 (*hns*⁻) de *Escherichia coli* **¡Error! Marcador no definido.**

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES DEL GÉNERO *RHIZOBIUM*

1.1.1. Fijación biológica de nitrógeno en el género *Rhizobium* y simbiosis con leguminosas

La mayor parte del nitrógeno que existe en la Tierra se encuentra en la atmósfera en forma de nitrógeno molecular (N_2). Sin embargo, la mayoría de los organismos vivos sólo pueden incorporar nitrógeno a partir de otros compuestos inorgánicos -como es el caso del nitrato y del amonio en las plantas- o bien a partir de compuestos orgánicos - como ocurre en los animales superiores-. Los organismos diazotrofos son los únicos seres vivos capaces de asimilarlo a partir del nitrógeno molecular atmosférico mediante un proceso denominado **fijación biológica de nitrógeno**. Este proceso consiste en la transformación de nitrógeno molecular (N_2) en amonio (NH_4^+) gracias al complejo enzimático de la nitrogenasa (Lluch y Ligeró, 1992; Kaminski et al., 1998).

Los seres diazotrofos son organismos procariotas en su mayoría de vida libre, pero algunos establecen asociaciones con plantas, como es el caso de las bacterias del género *Rhizobium*. Éstas se asocian con las plantas leguminosas a través de una simbiosis mutualista denominada endosimbiosis. En el caso de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, las leguminosas hospedadoras pertenecen a los géneros *Pisum*, *Vicia*, *Lens* y *Lathyrus* (Hadri et al., 1998). Las endosimbiosis se caracterizan por que el simbiote receptor acoge intracelularmente al otro simbiote, rodeándolo de una membrana que le separa del contacto directo con el citoplasma (Ahmadjian y Paracer, 1986). La simbiosis en los rizobios (rizoendosimbiosis) se lleva a cabo en el interior de unos órganos especializados que se desarrollan en la raíz de la planta hospedadora. Estos órganos reciben el nombre de nódulos (Figura 1.1) y es en ellos donde acontece la fijación de nitrógeno.



Figura 1.1: Nódulos en una raíz
(<http://sciborg.uwaterloo.ca/~tcharles/rhizobium.html>)

1.1.2. Familia *Rhizobiaceae*

1.1.2.1. Introducción

Las plantas de la familia Leguminosas (familia Fabáceas) son plantas dicotiledóneas que se clasifican dentro de la subclase Rósidas, orden Fabales. Esta familia contiene 674 géneros (Gunn et al., 1992) y de 16.000 a 19.000 especies (Allen y Allen, 1980). Las fabáceas tienen una distribución mundial y su importancia económica solo se encuentra por detrás de la familia de las gramíneas (familia Poáceas). Una característica propia de la familia Leguminosas es la formación de nódulos radicales, lo cual se observó por primera vez en el siglo XVI y posteriormente en el siglo XIX se consideró de interés diagnóstico para la identificación taxonómica de los miembros de dicha familia. Sin embargo, no todos los componentes de la familia Fabáceas pueden desarrollar nódulos y en una gran cantidad de especies aún no se ha examinado su capacidad para nodular (van Berkum y Eardly, 1998). Asimismo, existe una planta no leguminosa perteneciente a la familia *Ulmaceae* (género *Parasponia*) que es capaz de interactuar con bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Hadri et al., 1998).

Según Conn (1938) la nodulación y el posterior desarrollo de simbiosis fijadoras de nitrógeno en las fabáceas son la respuesta de estas plantas a la infección por bacterias de varios géneros de la familia *Rhizobiaceae*. Estas simbiosis son importantes en la naturaleza como fuente de nitrógeno, y para el hombre representan un medio económico y efectivo de restaurar el medio ambiente y de mejorar la producción de los cultivos. No obstante, no todos los géneros de la familia *Rhizobiaceae* son beneficiosos. Varias especies de *Agrobacterium* ocasionan daños en la planta, tales como tumores denominados agallas en corona o bien raíces en cabellera. El género *Phyllobacterium* da lugar a nódulos en las hojas de plantas superiores de las familias *Myrsinaceae* y *Rubiaceae*, y no está claro si estas hipertrofias de las hojas benefician o dañan a la planta (van Berkum y Eardly, 1998). La capacidad de producir hipertrofias en las plantas se considera la principal característica de las especies de la familia *Rhizobiaceae* (Knösel, 1984).

1.1.2.2. Historia

A finales del siglo XIX Hellriegel y Wilfart demostraron que el nitrógeno atmosférico es asimilado a través de los nódulos presentes en las raíces de las leguminosas. Beijerinck (1888) fue el primero en aislar bacterias a partir de los nódulos radicales y de esta manera estableció su papel como agentes causales de la asimilación de nitrógeno (Elkan, 1992). Propuso el nombre de *Bacillus radicola* para estas bacterias, pero fueron renombradas por Frank (1889) como *Rhizobium*. Curiosamente, Frank fue el único investigador que en la conferencia de 1886 en Berlín se negó a aceptar la fijación de nitrógeno atmosférico como explicación a los resultados de Hellriegel y Wilfart, criticándola además en varios artículos posteriores (Nutman, 1987).

La taxonomía de estos simbiosis y el número de especies aceptadas estuvo en disputa durante 30 años. En 1929 se reconocieron las siguientes especies de *Rhizobium*:

R. leguminosarum, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. japonicum*, *R. meliloti* y *R. lupini* (Fred et al., 1932). En un principio, la designación de nuevas especies se basó en los grupos de inoculación cruzada definidos por Fred et al. (1932) como “grupos de plantas entre las cuales los microorganismos noduladores son mutuamente intercambiables”. No obstante, en 1944 este sistema de caracterización taxonómica dejó de emplearse ya que una serie de interacciones planta-bacteria inexplicables e incongruentes puso en duda la validez del concepto (Wilson, 1944; Burton, 1979). Los indicadores taxonómicos pasaron a ser la velocidad de crecimiento, la producción de ácidos, la serología, el porcentaje de G+C, la taxonomía numérica, la hibridación de ADN y la susceptibilidad a fagos (Burton, 1979). A pesar de todo, la clasificación taxonómica de los simbioses propuesta en 1929 fue adoptada en la lista de nombres bacterianos aprobada en 1980 (Skerman et al., 1980). En esta lista también aparecían cuatro especies de *Agrobacterium*, aunque *Phyllobacterium* tuvo que esperar a que Knösel (1984) recuperara su nombre en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* al proponer la clasificación de dos especies (*P. myrsinacearum* y *P. rubiacearum*) dentro de la familia *Rhizobiaceae* basándose en los resultados de la hibridación ADN/ARNr de Gillis y de Ley (1980).

1.1.2.3. Taxonomía de la familia *Rhizobiaceae*

Varias características morfológicas y fisiológicas diferencian a *Rhizobium* de *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984), por lo que su clasificación como géneros separados es indiscutible (revisado en Elkan, 1992). De manera similar, el simbionte que nodula los tallos de *Sesbania rostrata*, *Azorhizobium caulinodans*, es distinto de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Dreyfus et al., 1988). Hasta hace poco los únicos géneros reconocidos dentro de la familia *Rhizobiaceae* aparte de *Rhizobium* eran *Agrobacterium* y *Phyllobacterium*. Sin embargo, se ha hecho evidente que dentro de *Rhizobium* existen tres grupos genéticos y se han hecho sugerencias para su separación en diferentes

géneros. La separación de *Sinorhizobium* (de Lajudie et al., 1994) se apoya en las secuencias del ARNr 16S, tal y como ocurre en el caso del género *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997). Las similitudes en las secuencias del gen ARNr 16S entre los géneros de la familia *Rhizobiaceae* van desde un 88,0% a un 97,0%. La información genética que justifica la separación de siete géneros en la familia *Rhizobiaceae* parece estar clara con la excepción de una especie de *Rhizobium*, *R. galegae*. Se necesita información adicional para decidir si es un género aparte, si debe continuar en *Rhizobium* o ser transferido a *Agrobacterium* (van Berkum y Eardly, 1998). En la Tabla 1.1 se encuentran los géneros y especies de la familia *Rhizobiaceae* según van Berkum y Eardly (1998).

Tabla 1.1: Géneros y especies de la familia *Rhizobiaceae* según van Berkum y Eardly (1998).

Especie	Leguminosa	Referencia bibliográfica
<i>Agrobacterium</i>		Conn, 1942
<i>A. radiobacter</i>		Beijerinck y van Delden, 1902
<i>A. rhizogenes</i>		Riker et al., 1930
<i>A. rubi</i>		Hildebrand, 1940
<i>A. tumefaciens</i>		Smith y Townsend, 1907
<i>A. vitis</i>		Ophel y Kerr, 1990
<i>Azorhizobium</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus et al., 1988
<i>Bradyrhizobium</i>		Jordan, 1982
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine, Macroptilium, Vigna</i>	Kuykendall et al., 1992
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine, Macroptilium, Vigna</i>	Jordan, 1982
<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine</i>	Xu et al., 1995
<i>Mesorhizobium</i>		Jarvis et al., 1997
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour et al., 1994b
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	Chen et al., 1991
<i>M. loti</i>	<i>Lotus, Anthyllis, Lupinus</i>	Jarvis et al., 1997
<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour et al., 1995
<i>M. tianshanense</i>	7 leguminosas de la provincia de Xinjiang (República Popular de China)	Chen et al., 1995
<i>Phyllobacterium</i>		Knösel, 1962
<i>Rhizobium</i>		Frank, 1889
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus y Medicago</i>	Segovia et al., 1993
<i>R. galegae</i>	<i>Galega orientalis, G. officinalis</i>	Lindström, 1989
<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger et al., 1997
<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger et al., 1997
<i>R. hainanense</i>	<i>Desmodium, Centrosema</i>	Chen et al., 1997
<i>R. leguminosarum</i>	<i>Vicia, Pisum, Lens, Lathyrus</i> (bv. <i>viciae</i>) <i>Trifolium</i> (bv. <i>trifolii</i>) <i>Phaseolus</i> (bv. <i>phaseoli</i>)	Frank, 1889
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i>	van Berkum et al., 1998
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus, Medicago, Leucaena, Macroptilium</i>	Martinez-Romero et al., 1991
“ <i>R. lupini</i> ”	<i>Lupinus</i>	Schroeter, 1886; Eckhardt et al., 1931
<i>Sinorhizobium</i>		de Lajudie et al., 1994
<i>S. fredii</i>	<i>Glycine, Vigna</i>	Scholla y Elkan, 1984
<i>S. medicae</i>	<i>Medicago truncatula, M. polymorpha</i>	Rome et al., 1996b
<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago, Trigonella, Melilotus</i>	Dangeard, 1926
<i>S. saheli</i>	<i>Sesbania, Acacia seyal, Leucaena leucocephala, Neptunia oleracea</i>	de Lajudie et al., 1994
<i>S. terangaie</i>	<i>Sesbania, Acacia</i>	de Lajudie et al., 1994

La clasificación taxonómica de esta familia se encuentra en permanente revisión. Esto lo podemos comprobar en el *Taxonomic Outline of the Prokaryotic Genera* de abril de 2001 (Garrity et al., 2001) del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2ª ed.), en el que la familia *Rhizobiaceae* ha perdido algunos géneros y además se han añadido otros nuevos, tal y como se indica en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2: Clasificación taxonómica de la familia *Rhizobiaceae* según el *Taxonomic Outline of the Prokaryotic Genera* de abril de 2001 (Garrity et al., 2001). *: nuevos géneros añadidos en la familia *Rhizobiaceae*, **: anteriormente *Sinorhizobium*.

Familia	Género
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Azorhizobium</i>
<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Allorhizobium</i>
	<i>Mesorhizobium</i>
	<i>Phyllobacterium</i>
<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Agrobacterium</i>
	<i>Carbophilus*</i>
	<i>Chelatobacter*</i>
	<i>Ensifer**</i>
	<i>Rhizobium</i>
	<i>Sinorhizobium</i>

Por otra parte, la definición de géneros es un problema actual en taxonomía. Aunque la definición de género se basa principalmente en la filogenia del gen ARNr 16S, no existe un estándar filogenético oficial para definir género. Esto ha llevado a decisiones conflictivas tales como la sugerencia de combinar los géneros *Agrobacterium* y *Rhizobium* (Young et al., 2001). La combinación de *Agrobacterium* y *Rhizobium* ha sido causa de una gran discusión y algunos autores quieren mantenerlos en géneros separados (Farrand et al., 2003). Asimismo *Sinorhizobium* y *Ensifer* pertenecen al mismo taxón, y como *Ensifer* es el sinónimo heterotípico anterior ha tomado prioridad sobre *Sinorhizobium* (Young, 2003). Los cambios en la nomenclatura quedan patentes en la Tabla 1.3:

Tabla 1.3: Nomenclatura actualizada de los géneros de la Tabla 1.1 según la lista *Bacterial Nomenclature Up-To-Date* de enero de 2005 compilada por DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*). ^a: sinónimo heterotípico de *Sinorhizobium adhaerens* y *S. morelense*; ^b: anteriormente *Sinorhizobium*; ^c: sinónimo heterotípico de *Phyllobacterium rubiacearum*; ^d: anteriormente *Agrobacterium*; ^e: sinónimo heterotípico de *Agrobacterium tumefaciens*; ^f: anteriormente *Allorhizobium*; *: incluidos en las listas aprobadas de nombres bacterianos (Skerman et al., 1980); **: incluido en una lista de validación del *International Journal of Systematic Bacteriology* (volumen:página).

Especie	Referencia bibliográfica
<i>Azorhizobium</i>	
<i>A. caulinodans</i>	Dreyfus et al., 1988
<i>Bradyrhizobium</i>	
<i>B. betae</i>	Rivas et al., 2004
<i>B. elkanii</i> ** (43:398)	Kuykendall et al., 1992
<i>B. japonicum</i>	Jordan, 1982
<i>B. liaoningense</i>	Xu et al., 1995
<i>B. yuanmingense</i>	Yao et al., 2002
<i>Ensifer</i>	
<i>E. adhaerens</i> ^a	Casida, 1982
<i>E. arboris</i> ^b	Young, 2003
<i>E. fredii</i> ^b	Young, 2003
<i>E. kostiensis</i> ^b	Young, 2003
<i>E. kummerowiae</i> ^b	Young, 2003
<i>E. medicae</i> ^b	Young, 2003
<i>E. meliloti</i> ^b	Young, 2003
<i>E. sahel</i> ^b	Young, 2003
<i>E. teranga</i> ^b	Young, 2003
<i>E. xinjiangensis</i> ^b	Young, 2003
<i>Mesorhizobium</i>	
<i>M. amorphae</i>	Wang et al., 1999
<i>M. chacoense</i>	Velázquez et al., 2001
<i>M. ciceri</i>	Jarvis et al., 1997
<i>M. huakuii</i>	Jarvis et al., 1997
<i>M. loti</i>	Jarvis et al., 1997
<i>M. mediterraneum</i>	Jarvis et al., 1997
<i>M. plurifarum</i>	de Lajudie et al., 1998
<i>M. septentrionale</i> ** (54:2011)	Gao et al., 2004
<i>M. temperatum</i> ** (54:2011)	Gao et al., 2004
<i>M. tianshanense</i>	Jarvis et al., 1997
<i>Phyllobacterium</i>	
<i>P. myrsinacearum</i> ^{c**} (34:356)	Knösel, 1984; Mergaert et al., 2002

Tabla 1.3. Continuación.

Espece	Referencia bibliográfica
<i>Rhizobium</i>	
<i>R. etli</i>	Segovia et al., 1993
<i>R. galegae</i>	Lindström, 1989
<i>R. gallicum</i>	Amarger et al., 1997
<i>R. giardinii</i>	Amarger et al., 1997
<i>R. hainanense</i>	Chen et al., 1997
<i>R. huautlense</i>	Wang et al., 1998
<i>R. indigoferae</i>	Wei et al., 2002
<i>R. larrymoorei</i> ^d	Young, 2004
<i>R. leguminosarum</i> *	Frank, 1889
<i>R. loessense</i>	Wei et al., 2003
<i>R. lupini</i> *	Schroeter, 1886; Eckhardt et al., 1931
<i>R. mongolense</i>	van Berkum et al., 1998
<i>R. phaseoli</i> *	Dangeard, 1926
<i>R. radiobacter</i> ^e	Young et al., 2001
<i>R. rhizogenes</i> ^d	Young et al., 2001
<i>R. rubi</i> ^d	Young et al., 2001
<i>R. sullae</i>	Squartini et al., 2002
<i>R. trifolii</i> *	Dangeard, 1926
<i>R. tropici</i>	Martínez-Romero et al., 1991
<i>R. undicola</i> ^f	Young et al., 2001
<i>R. vitis</i> ^d	Young et al., 2001
<i>R. yanglingense</i>	Tan et al., 2001
<i>Sinorhizobium</i>	
<i>S. americanum</i> ** (54:1909)	Toledo et al., 2003

1.1.2.4. Género *Rhizobium*

Las bacterias del género *Rhizobium* son bacilos rectos aerobios Gram-negativos, de 0,5-0,9 μm de diámetro y de 1,2-3,0 μm de longitud (Figura 1.2). Su movilidad es consecuencia de la existencia de un flagelo (polar o subpolar) o bien de 2 a 6 flagelos peritricos. No forman ni esporas ni quistes y, como anteriormente hemos mencionado, fijan el N_2 en simbiosis con plantas leguminosas. La temperatura óptima para su crecimiento va desde los 25 hasta los 30°C. El coeficiente de G+C es del 59-64% (Jordan, 1984).



Figura 1.2: Imagen de *Rhizobium leguminosarum*
(<http://www.cnpab.embrapa.br/servicos/baby/rizobio.html>).

Desde el punto de vista morfológico las células vegetativas jóvenes son bacilos cortos, pero en cultivos envejecidos o sometidos a condiciones ambientales adversas – como temperatura o pH extremos, ciertos antibióticos...- aparecen células pleomórficas.

En medio mineral con extracto de levadura y manitol forman colonias circulares, convexas, elevadas, semitranslúcidas y mucilaginosas. Alcanzan un diámetro de 2 a 4 mm tras una incubación de 3-5 días. Algunas cepas son encapsuladas y la mayoría produce abundantemente exopolisacáridos solubles en agua (EPSs).

Son organismos quimioorganotrofos y poseen un metabolismo respiratorio en el que el oxígeno es el aceptor terminal de electrones. Todas las cepas crecen rápidamente en medios minerales adicionados de extracto de levadura e hidratos de carbono, produciendo una acidez moderada. Se caracterizan por emplear una gran diversidad de fuentes de carbono así como una amplia serie de compuestos aromáticos.

1.1.3. Distribución ecológica de los rizobios

Las bacterias del género *Rhizobium*, además de establecer simbiosis con plantas leguminosas, se pueden encontrar como organismos de vida libre tanto en el suelo como en la rizosfera. Se puede definir la rizosfera como aquel volumen de suelo que se encuentra bajo la influencia directa de las raíces de una planta y/o en asociación con las raíces y pelos radicales, así como el material producido por la planta (Andrade et al., 1997; Mahaffee y Kloepper, 1997; Bringhurst et al., 2001). Este espacio incluye el suelo unido a las raíces de la planta, que a menudo se extiende unos pocos mm desde la superficie de la raíz (Bringhurst et al., 2001) y puede incluir la capa epidérmica de la raíz (Mahaffee y Kloepper, 1997). Los exudados de las plantas en la rizosfera, como los aminoácidos y los azúcares, proporcionan una fuente rica en energía y nutrientes para las bacterias, dando lugar a mayores poblaciones bacterianas dentro de esta área que fuera de la rizosfera. La mayoría de los organismos rizosféricos, incluyendo las bacterias del género *Rhizobium*, se encuentran a 50 μm desde la superficie de la raíz, y las poblaciones que se encuentran a 10 μm pueden alcanzar $1,2 \cdot 10^8$ células cm^{-3} o 10^9 - 10^{12} células microbianas g^{-1} de suelo. A pesar del gran número de bacterias que existen en la rizosfera, solo el 7-15% de la superficie total de la raíz está ocupada en general por células microbianas (Foster et al., 1983; Pinton et al., 2001).

El crecimiento de los rizobios en suelos carentes de plantas leguminosas es bastante lento. A pesar de ello, el suelo actúa como reservorio de las poblaciones nativas de rizobios, bien adaptadas a vivir en dicho entorno como microorganismos saprófitos. Como un miembro más de la microbiota de vida libre en el suelo, los rizobios están sometidos a las condiciones físico-químicas y biológicas del suelo y están obligados a competir con otros microorganismos para sobrevivir (Rodelas, 1995).

1.1.4. Especificidad de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa y factores que la controlan

En la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, los rizobios a cambio de otros nutrientes les proporcionan amonio a las leguminosas, lo cual es de gran importancia pues el nitrógeno reducido es normalmente el principal factor limitante del crecimiento vegetal. De esta manera el establecimiento de la simbiosis resulta de gran interés tanto desde el punto de vista agrícola como ecológico.

Aunque muchas plantas hospedadoras pueden establecer simbiosis con más de un rizobio efectivo y viceversa, sólo determinadas combinaciones de estos simbioses van a dar lugar a la formación de nódulos que fijen nitrógeno. La especificidad entre los simbioses compatibles minimiza las posibilidades de formación de asociaciones inefectivas (nódulos vacíos o bien nódulos con bacteroides incapaces de fijar nitrógeno), algo que no le conviene a ninguno de los simbioses (Perret et al., 2000). Se pueden distinguir dos tipos de rango de hospedador: el rango de hospedador estrecho (por ejemplo, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* que nodula *Trifolium* spp.) y el rango de hospedador amplio (por ejemplo, *Rhizobium* cepa NGR234 que nodula más de 50 géneros de plantas). Además, algunas bacterias están adaptadas a determinados cultivares de plantas hospedadoras, como *R. leguminosarum* bv. *viciae* cepa TOM que nodula *Pisum sativum* cv. Afghanistan (Hadri et al., 1998).

En varias especies de *Rhizobium*, la mayoría de los genes de la nodulación, la fijación de nitrógeno y la biosíntesis de exopolisacáridos se encuentran en uno o más megaplásmidos conocidos como plásmidos simbióticos (Sym) (Beynon et al., 1980; Huguet et al., 1983; Wijffelman et al., 1983; Banfalvi et al., 1985). Por el contrario, las especies de *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Mesorhizobium* portan la mayoría de la

información simbiótica en *clusters* o islas en el cromosoma (González y Marketon, 2003). Parece ser que la isla de simbiosis de *Mesorhizobium loti* puede ser transferida horizontalmente por conjugación de una cepa simbiótica a otra no simbiótica (Sullivan y Ronson, 1998). En *R. leguminosarum* bv. *viciae* cepa A34 la mayor parte de los genes simbióticos se encuentra en el plásmido simbiótico pRL1JI. Se ha encontrado un *cluster* de genes que tienen homología con el operón *trb* y los reguladores *tra* de *Agrobacterium tumefaciens*, y parece que están relacionados con la transferencia del plásmido simbiótico (Wilkinson et al., 2002).

La nodulación es un proceso muy complejo en el que intervienen varias moléculas señales, que sirven para pasar lo que podríamos llamar “puntos de control”. En las primeras fases de la nodulación (curvatura del pelo radical y entrada de los rizobios) estas señales son los flavonoides y los factores Nod. Las proteínas NodD son las interlocutoras del tráfico molecular en la rizosfera. Existen numerosas revisiones acerca del proceso de nodulación, de las que podríamos destacar las siguientes: Hirsch (1992), Denarie et al. (1992), Hirsch et al. (2001) y Gage (2004). Los factores que influyen en el control de la especificidad de la simbiosis (Perret et al., 2000) son los siguientes:

- Inductores: en la rizosfera encontramos varios inductores producidos por las plantas como son las betainas (estaquidrina y trigonelina) y los ácidos aldónicos eritrónico y tetrónico (Phillips et al., 1992; Gagnon e Ibrahim, 1998), pero los más importantes son un grupo de flavonoides (Perret et al., 2000). Los flavonoides, además de inducir la quimiotaxis de los rizobios, interactúan como agliconas con las proteínas NodD. Estas proteínas, que forman parte de la familia LysR de reguladores transcripcionales, son capaces de unirse en forma de tetrámero a motivos conservados de 47 pb (cajas *nod*) presentes en los promotores de los genes de la nodulación (*nod*, *nol* y *noe*) (Feng et al., 2003). Sin embargo, la activación de estos genes requiere la interacción de la proteína NodD con flavonoides compatibles (Fisher y Long, 1993). La

transcripción y posterior traducción de los genes de la nodulación da lugar a los factores Nod, de los que hablaremos en el siguiente apartado. La producción de los factores Nod debe estar estrictamente regulada para que la simbiosis tenga éxito. Por ello, los rizobios han desarrollado complejas redes reguladoras que controlan la transcripción de los genes de la nodulación tanto espacial como temporalmente (Schlaman et al., 1998; Kobayashi et al., 2004). Una revisión reciente de los genes de la nodulación se puede encontrar en Downie (1998) y en Perret et al. (2000).

- Factores Nod: los rizobios, en respuesta a los inductores específicos secretados por las plantas, producen y secretan una familia de lipooligosacáridos derivados de la quitina denominados factores Nod. El esqueleto básico de los factores Nod es el resultado de la acción de tres proteínas: NodA, NodB y NodC. En primer lugar NodC, que es una *N*-acetilglucosamina- β -(1-4)-transferasa, genera el esqueleto de la quitina a partir de UDP-*N*-acetil-D-glucosamina. A continuación NodB elimina un grupo acetilo del residuo terminal del oligómero de quitina y NodA cataliza la transferencia de un grupo acilo al grupo amino libre a partir de un grupo acil-ACP (*Acyl Carrier Protein* o proteína transportadora de acilos) (Hirsch et al., 2001). El esqueleto puede tener varios sustituyentes, cuya función va a ser mejorar la interacción específica con ciertas plantas o bien proteger al factor Nod de la degradación. Tales sustituyentes pueden ser ácidos grasos insaturados (*nodEF*), azúcares como arabinosa (*noeC*) y fucosa (*nodZ*, *nolK*), grupos sulfato (*nodH*, *noeE*), acetilo (*nodL*, *nodX*, *noll*), metilo (*nodS*, *noeI*) y carbamoilo (*nodU*, *nolO*) (Perret et al., 2000) (ver Figura 1.3).

Por otra parte, parece claro que para conseguir la inducción de la nodulación son también importantes los niveles absolutos y la composición y proporción relativa de las mezclas de factores Nod secretadas por los rizobios (Ovtsyna et al., 1999).

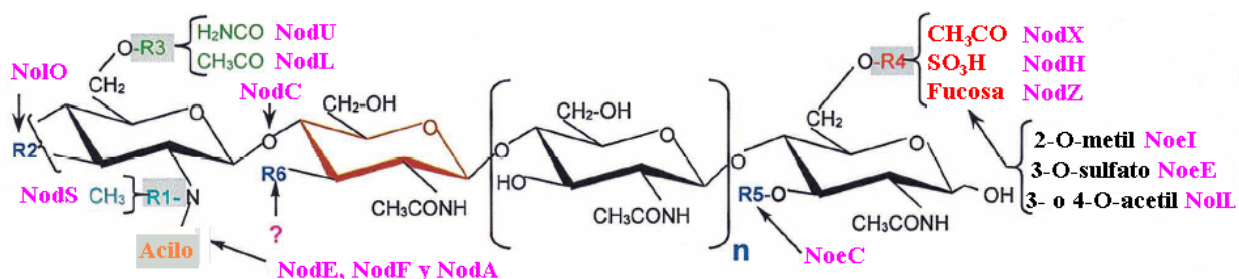


Figura 1.3: Esqueleto de los factores Nod y sustituyentes. Adaptado de Perret et al. (2000).

- Receptores de factores Nod: El gen *DMI2* (*Does not Make Infection*) de *Medicago truncatula*, y sus ortólogos en alfalfa (*NORK- Nodulation Receptor-like Kinase*), *Lotus japonicus* (*SYMRK- Symbiosis Receptor-like Kinase*) y guisante (*sym19*), es el primer gen relacionado con las primeras fases de señalización que ha sido clonado (Endre et al., 2002; Stracke et al., 2002). Codifica una proteína quinasa tipo receptor que contiene un dominio extracelular con tres repeticiones ricas en leucina, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con actividad serina/treonina quinasa. Esta estructura indica que *DMI2* está relacionado con la percepción de una señal y la posterior transducción de ésta (Esseling y Emons, 2004).

Asimismo, Amor et al. (2003) encontraron una mutante de *Medicago truncatula* (*NFP- Nod Factor Perception*) que no responde tras la aplicación de factores Nod o de rizobios. El gen *nfp* parece estar relacionado con las primeras fases de señalización y podría estar justo después o en el punto de percepción de los factores Nod, o incluso ser un receptor (Esseling y Emons, 2004).

Radutoiu et al. (2003) hallaron en *Lotus japonicus* dos genes, *NFR1* y *NFR5* (*NOD-FACTOR RECEPTOR*), cuyas proteínas poseen dos o tres motivos LysM extracelulares, los cuales aparecen en enzimas que se unen a polímeros que contienen *N*-acetilglucosamina (Amon et al., 1998; Bateman y Bycroft, 2000). Por lo tanto, parece que estas proteínas se unen a los factores Nod por los dominios LysM, activando la

cascada de señalización a través del dominio quinasa intracelular. Los receptores LysM probablemente actúen junto con la proteína receptora SYMRK (Endre et al., 2002; Stracke et al., 2002). Las proteínas NFR1 y NFR5 son necesarias en las primeras etapas de la interacción planta-rizobio, pero otros resultados indican que también están relacionadas con etapas posteriores como el mantenimiento del crecimiento de los cordones de infección [*LYK3* en *Medicago truncatula* (similar a *NFR1*) (Limpens et al., 2003)] (Parniske y Downie, 2003). Una revisión reciente de los receptores de factores Nod se puede encontrar en Riely et al. (2004).

- Polisacáridos: Los elementos de la pared celular de los rizobios importantes desde un punto de vista simbiótico son: exopolisacáridos (exopolisacáridos ácidos y β -glucanos cíclicos), lipopolisacáridos y polisacáridos capsulares. Los exopolisacáridos parece que son esenciales en las primeras etapas del proceso de infección, concretamente con plantas hospedadoras que desarrollan nódulos indeterminados. Los lipopolisacáridos tienen funciones específicas en las últimas etapas del proceso de nodulación, tales como la penetración del cordón de infección en las células corticales o el establecimiento del fenotipo de fijación de nitrógeno. De forma más general, todos los tipos de polisacáridos parecen estar implicados en procesos complejos de inhibición de las defensas de la planta, lo que permite la invasión de la raíz de la planta (revisado en Fraysse et al., 2003).

- Proteínas secretadas: Varias cepas de *Rhizobium* secretan proteínas que son importantes en la simbiosis, como por ejemplo la proteína NodO (Perret et al., 2000). Esta proteína está codificada por el gen de la nodulación *nodO*, cuyo promotor se encuentra bajo el control de NodD y es inducible por flavonoides (Economou et al., 1990). Se ha visto que la proteína NodO contiene repeticiones de unión a calcio, forma poros en membranas y puede ser un determinante del rango de hospedador (Sutton et al., 1994; Vlassak et al., 1998). La sobreexpresión de *nodO* fue capaz de complementar

en parte el fenotipo de una mutante de *R. leguminosarum* bv. *viciae* por delección de los genes *nodFEMNTLO*, que no producía factores Nod con sustituyentes específicos del hospedador y que era incapaz de formar nódulos en plántulas de veza. Se observó que en esta mutante las bacterias se acumulaban en grandes masas en los cayados de los pelos radicales y no iniciaban la formación del cordón de infección. Por otra parte, la mutante doble *nodE/nodO* indujo infecciones aberrantes, mientras que las mutantes *nodE* y *nodO* no lo hacían (Walker y Downie, 2000). El fenotipo de la mutante doble *nodE/nodO* era igual que el de la mutante por delección *nodFEMNTLO*, excepto en el hecho de que se formaban algunos cordones de infección. Sin embargo, estos cordones de infección estaban hinchados, deformados y contenían altos números de bacterias y además existían agregados de bacterias en los sitios de infección. Parece que en las dos mutantes anteriores las bacterias crecen demasiado durante la invasión del hospedador. Es probable que el factor Nod sea el responsable de ralentizar el crecimiento de los rizobios de forma indirecta, activando respuestas en las células radicales que a su vez podrían reprimir el crecimiento bacteriano. Tiene sentido que una planta pudiera regular el crecimiento de los rizobios dentro del cordón de infección ya que este tiene una tasa de expansión limitada y las bacterias proliferan rápidamente (Gage y Margolin, 2000).

- Lectinas: Parece ser que las lectinas podrían servir para facilitar la unión específica de bacterias compatibles a los pelos radicales y así aumentar la concentración del factor Nod en el sitio de entrada del rizobio. Las lectinas no se unen a los factores Nod por lo que deben interactuar con otros componentes de la superficie celular del rizobio. Sin embargo, aún no se sabe si las lectinas son absolutamente esenciales para la nodulación (Hirsch et al., 2001).

Asimismo, las acil-homoserina lactonas se podrían incluir en la lista de señales simbióticas, ya que se ha visto que el mecanismo de *quorum sensing* o percepción de quórum se encuentra relacionado con la eficiencia de nodulación, el desarrollo del

simbiosoma, la producción de exopolisacárido y la fijación de nitrógeno, siendo todos estos fenómenos muy importantes para el establecimiento de una simbiosis efectiva (González y Marketon, 2003).

1.1.5. El problema de la competición entre cepas del género *Rhizobium*

La capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico e inducir la nodulación en las leguminosas varía mucho entre las distintas cepas de *Rhizobium* spp. Sin embargo, estas características no están correlacionadas con la capacidad competitiva de dichas cepas para sobrevivir en el suelo y nodular las raíces de las plantas.

Numerosas cepas nativas de *Rhizobium* spp. del suelo se encuentran muy bien adaptadas a su medio ambiente, como consecuencia de su alta diversidad tanto fenotípica como genotípica, y resultan ser altamente competitivas frente a cepas inoculantes seleccionadas por sus mejores capacidades de fijación de nitrógeno y/o nodulación (Dowling y Broughton, 1986). Mediante modificaciones genéticas se pueden conseguir cepas con mayor capacidad de fijar nitrógeno, pero para que puedan ser empleadas como inoculantes de plantas leguminosas sin ser desplazadas por las cepas nativas es necesario buscar soluciones al problema de la competición (Triplett y Sadowsky, 1992).

Los factores que afectan a la competición se pueden dividir según Dowling y Broughton (1986) en biológicos, ecológicos y otros, como la presencia de herbicidas y pesticidas. Entre los factores biológicos se pueden mencionar el efecto de los bacteriófagos, la presencia de la bacteria patógena vegetal *Erwinia herbicola* y las micorrizas vesículo-arbusculares, entre otros. Los factores medioambientales afectan al crecimiento tanto de la planta como del rizobio. Al ser la planta la que desarrolla la

rizosfera en la que deben crecer los rizobios y los nódulos que deben ser posteriormente colonizados, cualquier factor ecológico que influya negativamente en el crecimiento de la planta afectará a la competencia. Un resumen de todos los factores ecológicos se puede ver en la Figura 1.4.

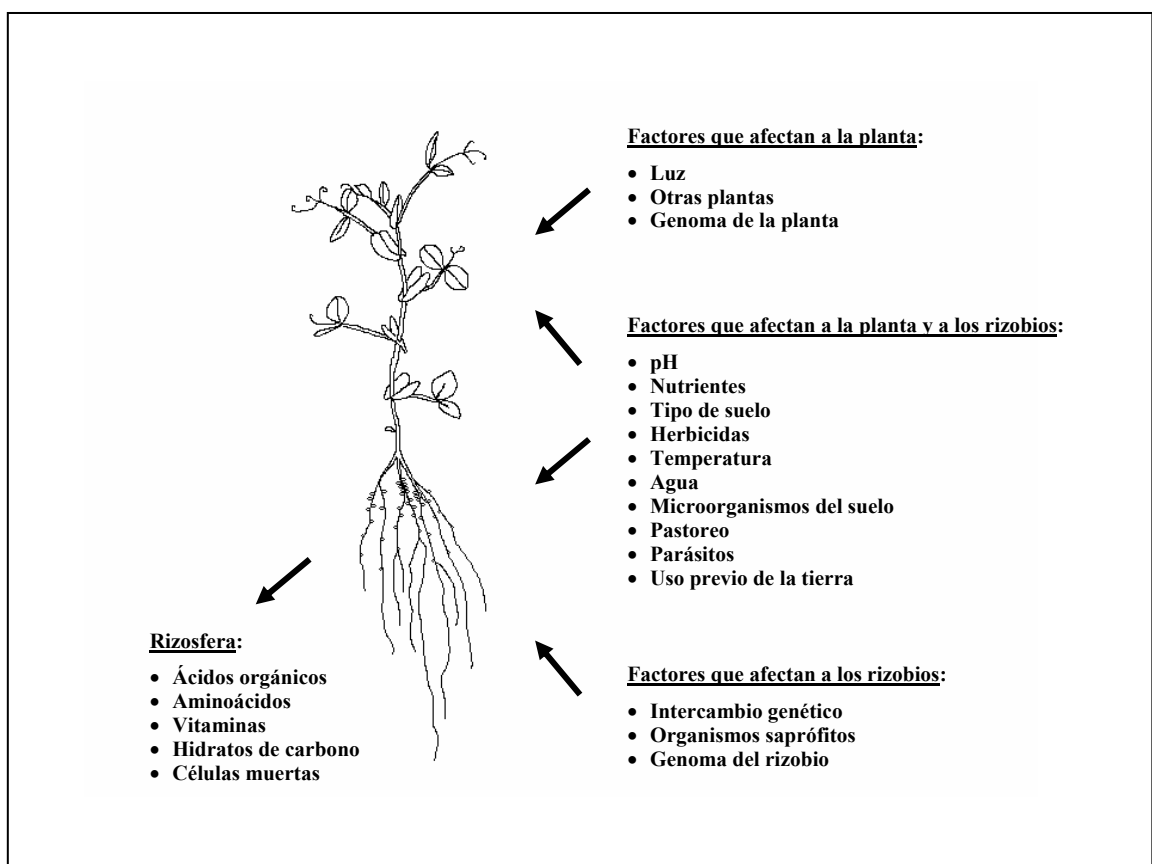


Figura 1.4: Factores que pueden influenciar la competencia entre cepas de *Rhizobium* por la nodulación de las leguminosas. Adaptado de Dowling y Broughton (1986).

Por otra parte se han identificado varios fenotipos que juegan un papel significativo en la competencia por la nodulación (Triplett y Sadowsky, 1992): quimiotaxis y movilidad, velocidad de nodulación, efectividad simbiótica, características de la superficie celular, eficiencia de la nodulación y antibiosis.

Quimiotaxis y movilidad

La mayoría de los rizobios poseen flagelos y gracias a ellos pueden dirigirse hacia los atrayentes (p. ej. azúcares) o alejarse de los irritantes (p. ej. antibióticos). Los mejores atrayentes para *Rhizobium leguminosarum* son un amplio grupo de azúcares como la D-glucosa, la celobiosa y el manitol, con la excepción de la sacarosa o de la trehalosa (Bowra y Dilworth, 1981). La movilidad también depende del pH y además es activada por los iones Ca^{2+} e inhibida por los iones Cu^{2+} . Gaworzewska y Carlile (1982) encontraron que *Rhizobium leguminosarum* era atraída por los exudados de *Pisum sativum*. Al caracterizar el exudado se vio que muchas de sus fracciones tenían una naturaleza atrayente, incluso aquellas de bajo peso molecular. Asimismo se observó que la atracción no era totalmente específica ya que el mismo exudado podía atraer a otras especies de *Rhizobium* y por otra parte *R. leguminosarum* podía ser atraída por los exudados de otras leguminosas.

La propagación de los rizobios en el suelo depende claramente de la quimiotaxis y de la movilidad de la cepa, así como del tipo de suelo y de su contenido en agua. No obstante, varios trabajos sostienen que la movilidad no es esencial para la nodulación, pero sí para la competitividad (Triplett y Sadowsky, 1992). Como ejemplo de la anterior afirmación destacan los trabajos de Ames y Bergman (1981) que examinaron mutantes no móviles de *Sinorhizobium meliloti* flageladas y no flageladas y encontraron que ambos tipos de mutantes eran menos competitivas que la cepa silvestre, manteniendo la misma tasa de crecimiento y capacidad de nodulación. Mellor et al. (1987) también comprobaron que mutantes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 por inserción del transposón Tn5 defectivas en la movilidad eran menos competitivas que la cepa silvestre, sin que estuvieran perjudicadas en su crecimiento.

En *Rhizobium leguminosarum* se han encontrado varios genes (*mcpB-mcpF*) que codifican para proteínas MCPs (proteínas quimiotácticas aceptoras de metilos), las cuales juegan un papel muy importante en la respuesta quimiotáctica de muchas bacterias. Lo verdaderamente interesante ha sido comprobar que al realizar estudios de competición de una cepa silvestre con dos mutantes en los genes *mcpB* y *mcpC* respectivamente, estas últimas formaban menos nódulos. Estos resultados y los de otros autores parecen confirmar que realmente la quimiotaxis cumple un papel clave en la competición (Yost et al., 1998).

Velocidad de nodulación

La infección temprana de las raíces de leguminosas induce una respuesta autorreguladora en la planta que previene la infección por inoculaciones posteriores (Bhuvaneswari et al., 1980, 1981; Pierce y Bauer, 1983; Kosslak y Bohlool, 1984; Stephens y Cooper, 1988). Esto ha sido demostrado en sistemas de raíces divididas, en las que los dos lados de la raíz están separados y son inoculadas a distintos tiempos (Kosslak y Bohlool, 1984; Sargent et al., 1987). La nodulación es reprimida en aquel lado que se inocula veinticuatro horas más tarde. Al aumentar el intervalo de tiempo entre las inoculaciones se incrementa la supresión de la nodulación (Kosslak et al., 1983). La supresión de la nodulación tardía ocurre en la fase de desarrollo del meristemo nodular previo al crecimiento del nódulo (Calvert et al., 1984). Algunos investigadores (Labandera y Vincent, 1975; van Rensburg y Strijdom, 1982; Kosslak et al., 1983; Handelsman et al., 1984; Stephens y Cooper, 1988; Oliveira y Graham, 1989; Trinick y Hadobas, 1989; McDermott y Graham, 1990) han encontrado una correlación entre la velocidad de nodulación y la competitividad. No obstante, los estudios de competición deberían realizarse entre cepas isogénicas para poder obtener resultados concluyentes.

Efectividad simbiótica: efecto de las mutaciones en los genes nod y nif sobre la competición por la nodulación

Las mutaciones en varios genes de la nodulación (*nod*) pueden dar lugar a la falta de estimulación de la respuesta autorreguladora, tasas de infección inferiores, disminución de la competitividad por la nodulación y mal desarrollo del nódulo (Sargent et al., 1987; Hahn y Hennecke, 1988). Las mutaciones en los genes *nodVW* de *Bradyrhizobium japonicum* ocasionan un retraso en la nodulación (Göttfert et al., 1990; Göttfert, 1993) y una mutación en el gen *nolJ* de la cepa USDA 201 de *Sinorhizobium fredii* también da lugar a un retraso en la formación de nódulos, a una menor eficiencia de nodulación y a un descenso en la competitividad (Boundy-Mills et al., 1994). Sin embargo, existen resultados contradictorios sobre si las mutaciones en los genes *nif* o *fix* afectan a la competitividad. Mientras que en algunos estudios parece que las plantas seleccionan a los microsimbiontes que fijan nitrógeno de manera eficiente (George y Robert, 1991), en otros no existe dicha discriminación (Sadowsky y Graham, 1998). Quizás el mejor estudio para ilustrar este punto es el de Hahn y Studer (1986). Estos investigadores obtuvieron una mutante *Tn5* de *Bradyrhizobium japonicum* 110*spc4* en el gen *nifD* (necesario para la síntesis de una de las subunidades de la nitrogenasa) y encontraron que a pesar de tener el fenotipo Fix^- podía competir en igualdad de condiciones con la cepa silvestre por la nodulación de soja.

Características de la superficie celular

La composición de la superficie celular juega un papel importante en la competición por la nodulación. Las mutantes no mucosas de la cepa USDA208 de *Rhizobium fredii* compiten mejor por la nodulación de las raíces de soja “Peking” que la cepa nativa (Zdor y Pueppke, 1991). No obstante, las mutantes por inserción de *Tn5* de las especies *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. tropici* y *Bradyrhizobium japonicum* deficientes en

la producción de exopolisacárido son menos competitivas que las cepas silvestres (Araujo y Handelsman, 1990; Bhagwat et al., 1991). Bhagwat et al. (1991) aislaron y mapearon la región de la cepa USDA 110 de *Bradyrhizobium japonicum* homóloga de la zona con la inserción de Tn5 de la cepa mutante y pudieron complementar el fenotipo mucoso y la competitividad en dicha mutante. Asimismo, una mutante de *Sinorhizobium meliloti* defectiva en la producción de lipopolisacárido presenta un retraso en la formación de nódulos, produce menos nódulos y tiene una competitividad reducida por la nodulación de alfalfa en relación a la cepa silvestre (Lagares et al., 1992).

Eficiencia de la nodulación

La capacidad de un microsimbionte de nodular eficientemente a su leguminosa tiene un efecto directo en la competición por la nodulación. Se ha identificado una región (*nfe*; *nodule formation efficiency*) en un plásmido críptico de *Sinorhizobium meliloti* GR4 que influencia la cinética de la nodulación y la competición por la nodulación en la alfalfa (Sanjuan y Olivares, 1989, 1991). Las mutaciones en esta región retrasan la formación de los nódulos en uno o dos días y por otra parte también disminuyen la competitividad de la mutante. Asimismo mediante fusiones *lacZ* se ha comprobado que la expresión de los genes *nfe* depende del sistema regulador NifA-RpoN (Sanjuan y Olivares, 1989; Soto et al., 1993). En *Bradyrhizobium japonicum* se ha identificado un gen tipo *nfe*, *nfeC*, que también afecta a la competitividad (Chun y Stacey, 1994).

Antibiosis

Algunas cepas de *Rhizobium* producen antibióticos o poseen fagos (Schwinghamer y Belkengren, 1968; Schwinghamer, 1971; Schwinghamer et al., 1973; Joseph et al., 1983; Hodgson et al., 1985; Hashem et al., 1986; Hashem y Angle, 1988). Algunas de

estos agentes pueden inhibir específicamente a otras cepas de *Rhizobium*, como ocurre con las bacteriocinas, cuya producción por las bacterias del suelo está bien documentada. Dos revisiones de carácter general acerca de las bacteriocinas se pueden encontrar en Daw y Falkner (1996) y en Riley y Wertz (2002).

Los genes que codifican estos factores antibióticos pueden proporcionar una mayor competitividad e incluso pueden tener el mismo efecto cuando son transferidos a otra cepa (Triplett, 1988). Existen varios trabajos que muestran el papel de la producción de bacteriocinas como ventaja en la competición saprofítica y en la competición por la nodulación entre cepas productoras de bacteriocina y otras cepas de *Rhizobium* (Wilson et al., 1998). Schwinghamer y Brockwell (1978) comprobaron que cepas productoras de bacteriocina de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* pueden inhibir el crecimiento de cepas sensibles en cultivos de laboratorio en medios líquidos, así como su supervivencia en inoculantes de turba. Posteriormente, Hodgson et al. (1985) observaron que cuando se emplea un inóculo mixto de una cepa productora de bacteriocina de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (CB782) y una cepa resistente a la bacteriocina, la presencia de la bacteriocina supone una gran ventaja para la cepa resistente tanto en medio sólido como en suelo. Triplett y Barta (1987) observaron que el gen de la bacteriocina denominada trifolitoxina (ver apartado 1.2.3.2) de la cepa altamente competitiva T24 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* determina una mayor capacidad competitiva de las cepas productoras frente a las cepas sensibles a la trifolitoxina. En el apartado 1.2 se describen las características de las bacteriocinas con más detalle.

1.2. BACTERIOCINAS

1.2.1. Definición de bacteriocina

La definición de las bacteriocinas desde un punto de vista funcional es la siguiente: las bacteriocinas son agentes inhibidores específicos no autopropagables que actúan antagonicamente sobre otra/s cepa/s estrechamente relacionada/s con la productora, independientemente de su naturaleza química, mecanismo o localización de los genes que codifican su síntesis y regulación (Tagg et al., 1976; Reeves, 1979; Jack et al., 1995).

En 1925 Gratia observó que una cepa de *Escherichia coli* producía un antibiótico altamente específico (principio V) que era activo frente a otras cepas de la misma especie. Este tipo de antibiótico específico también se encontró en varias especies de la familia *Enterobacteriaceae* y por ello se propuso el término colicina. Sin embargo, al descubrirse que la producción de agentes aparentemente similares no estaba limitada a la familia *Enterobacteriaceae*, Jacob et al. (1952) propusieron que el nombre general bacteriocina debería ser usado para las proteínas antibacterianas altamente específicas producidas por determinadas cepas de bacterias que son activas principalmente frente a las cepas de la misma especie. Se han encontrado bacteriocinas en casi todas las cepas bacterianas examinadas hasta la fecha, y dentro de una misma especie se pueden sintetizar decenas o incluso cientos de bacteriocinas diferentes (James et al., 1991; Riley y Gordon, 1992; Riley y Wertz, 2002). De acuerdo con Klaenhammer, el 99% de las bacterias podrían producir al menos un tipo de bacteriocina y la única razón por la que no se han aislado más bacteriocinas es que no han sido buscadas por muchos investigadores (Klaenhammer, 1988 ; Raloff, 1998). Las bacteriocinas más estudiadas son las colicinas producidas por *Escherichia coli* y enterobacterias relacionadas (Daw y Falkner, 1996).

El primer investigador que habló de actividad bacteriocinogénica en *Rhizobium* fue Roslycky (1967), quien acuñó el término rizobiocina para designar a este tipo concreto de bacteriocinas. Desde 1967 la producción de rizobiocinas ha sido descrita en casi todas las especies de *Rhizobium* y a menudo se ha mencionado la ventaja competitiva que supone para las cepas que las producen (Triplett y Sadowsky, 1992; Wilson et al., 1998).

1.2.2. Clasificación de las bacteriocinas de *Rhizobium*

La clasificación de las rizobiocinas resulta muy complicada debido a la gran heterogeneidad que presentan en su composición, peso molecular y propiedades físicas y químicas, así como al desconocimiento de la estructura y bases genéticas de la mayor parte de ellas. La solución propuesta es la de realizar una clasificación arbitraria en función del tamaño de las zonas de inhibición y, sobre todo, de propiedades físicas y bioquímicas como la termorresistencia, la solubilidad, la sensibilidad a enzimas y la difusión a través de membranas de filtración y diálisis. De esta manera podemos dividir a las rizobiocinas en dos grupos (Schwinghamer, 1975; Hirsch, 1979):

I. Rizobiocinas de alto peso molecular o tipo fago (*phage-like*):

Se trata de fagos defectivos. Se asemejan a alguno o a todos los componentes de un fago normal y retienen la actividad lítica, pero son incapaces de replicarse en ningún hospedador conocido. Frecuentemente son inducibles con luz ultravioleta y difunden poco en medio sólido. Debido a su peso molecular se pueden separar fácilmente en medio líquido. La producción de este tipo de bacteriocinas se ha descrito en *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (Schwinghamer, 1975; Joseph et

al., 1985) y en una cepa de *Rhizobium* aislada de nódulos de altramuz (Lotz y Mayer, 1972).

II. Rizobiocinas de bajo peso molecular:

Se caracterizan por difundir con facilidad en medio sólido. Según su tamaño y estabilidad se dividen a su vez en dos categorías:

a. Tipo pequeño (*small*):

Son dializables y resistentes al calor y a las enzimas proteolíticas. Como consecuencia de su bajo peso molecular su difusión en agar es muy rápida por lo que producen zonas de inhibición de muy gran tamaño. Su producción ha sido descrita en cepas de *Rhizobium leguminosarum* (Hirsch, 1979; van Brussel et al., 1985). van Brussel et al. (1985) observaron que existía una fuerte resistencia cruzada entre las cepas bacteriocinogénicas y dedujeron que estas rizobiocinas debían ser idénticas o estar estrechamente relacionadas. Posteriormente se analizó la estructura de la rizobiocina por HPLC (Cromatografía de líquidos de alta resolución) y RMN (Espectroscopia de resonancia magnética nuclear) a partir de extractos obtenidos en cloroformo, y se determinó que se trata de una acil-homoserina lactona (AHL), concretamente la *N*-(3*R*-hidroxi-7-*cis*-tetradecanoil)-L-homoserina lactona (3-OH-C_{14:1}-HSL) (Gray et al., 1996; Schripsema et al., 1996). Las AHLs son moléculas que se encuentran involucradas en los mecanismos de comunicación célula-célula y no se pueden considerar bacteriocinas en un sentido estricto.

Por otra parte, si nos basamos en las características generales de las rizobiocinas de tipo pequeño, la trifolitoxina (Triplett y Barta, 1987) también puede ser incluida dentro de este grupo. Se trata de un péptido dializable y termoestable producido por la cepa T24 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, que se caracteriza por ejercer un potente efecto bacteriostático (Schwinghamer, 1971). En el apartado 1.2.3 se hablará con más detalle de las AHLs y de la trifolitoxina.

b. Tipo medio (*medium*):

No son dializables, pero sí sensibles al calor y a menudo también a enzimas proteolíticas, a diferencia de las bacteriocinas de tipo pequeño. Existe una escasa resistencia cruzada entre las especies que la producen. Los genes que las codifican forman parte de plásmidos grandes, que pueden contener asimismo genes de la nodulación (Brewin et al., 1980). La producción de este tipo de bacteriocinas se ha observado en varias cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* y *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Hirsch, 1979; Joseph et al., 1983; Rodelas et al., 1998; Oresnik et al., 1999; Venter et al., 2001; Hafeez et al., 2004). Resulta interesante que las bacteriocinas de tipo medio que han sido caracterizadas a nivel molecular hasta la fecha muestran homología con la familia de proteínas RTX (Oresnik et al., 1999; Twelker et al., 1999; Venter et al., 2001), por lo que esta familia de proteínas va a ser descrita con más detalle en el apartado 1.2.4.

1.2.3. Bacteriocinas de tipo pequeño (*small*)

1.2.3.1. Acil-homoserina lactonas

Mecanismo de percepción de quórum

Las AHLs son señales moleculares de las bacterias Gram-negativas que están relacionadas con la comunicación intercelular (Fuqua et al., 1996; Whitehead et al., 2001) mediante un mecanismo denominado percepción de quórum (*quorum sensing*).

Las bacterias, a pesar de ser organismos unicelulares, son individuos sociales que forman asociaciones multicelulares. En algunos casos esta asociación conlleva una diferenciación o especialización de células individuales dentro de la población, estableciéndose así un reparto de tareas. Sin embargo, esta organización multicelular y este comportamiento coordinado puede presentarse también en poblaciones bacterianas homogéneas, en las que no aparece este reparto de tareas: la bacteria se diferencia como parte de una respuesta masiva en la que la población como un todo altera su morfología, fisiología o comportamiento. No obstante, antes de cualquier respuesta en grupo es necesario conocer la densidad de la población. Esta es la causa de que las bacterias hayan desarrollado mecanismos para sentir la densidad poblacional y regular la expresión de sus genes conforme a ella.

Uno de los mecanismos reguladores más extendidos es el de percepción de quórum. La regulación de los genes en función de la densidad celular normalmente está mediada por la acumulación en el medio ambiente exterior de uno o más compuestos señal sintetizados por la propia bacteria (Kaiser, 1996). Estos compuestos salen fuera de la célula por difusión y sólo son detectados cuando la bacteria se encuentra en densidad

alta o cuando está en un ambiente restringido, pues de esta manera la señal se acumula hasta llegar al umbral de concentración requerido para la activación de sus genes. De esta forma se consigue la comunicación intercelular entre bacterias que no están en contacto. Como ya hemos mencionado anteriormente, las moléculas señales más comunes en los sistemas de percepción de quórum de las bacterias Gram-negativas son las acil-homoserina lactonas, generalmente llamadas autoinductores. Las funciones de comportamiento o fisiológicas reguladas por ellas son muy diversas: bioluminiscencia, conjugación, producción de antibióticos, expresión de factores de virulencia, expresión de genes de la rizosfera... (Whitehead et al., 2001), pero todas tienen en común que para ser llevadas a cabo hace falta que haya un número suficiente de células. Por otra parte, Redfield (2002) ha definido el término “percepción de difusión” (*diffusion sensing*): es posible que la secreción y respuesta a los autoinductores sea para la bacteria una forma de detectar si las moléculas secretadas se alejan de la célula. Esto permitiría a las bacterias regular la secreción de efectores tales como enzimas degradativas, antibióticos, surfactantes, y sideróforos, para minimizar las pérdidas por difusión extracelular (Redfield, 2002; González y Marketon, 2003).

La primera vez que se investigó este mecanismo dependiente de AHL fue en *Vibrio fischeri* (*Photobacterium fischeri*), en el que los genes responsables de la bioluminiscencia (genes *lux*) se expresaban en respuesta al número creciente de células. Desde el principio estuvo claro que sólo había dos genes principales -*luxI* y *luxR*- (Devine et al., 1989), aunque existían otros genes menos importantes con una función moduladora (Kuo et al., 1996). Los genes *lux* están organizados en dos unidades transcripcionales divergentes separadas aproximadamente por 155 pares de bases. Uno de ellos contiene siete genes que forman el operón *luxICDABEG* y el promotor P_R. El otro sólo posee el gen *luxR* y el promotor P_L (Engebrecht y Silverman, 1984, 1987; Devine et al., 1988). El producto del gen *luxI* es el responsable de generar la señal *N*-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona (3-oxo-C₆-HSL) y el producto del gen *luxR* es una

proteína reguladora a la que se une el autoinductor (AHL) y que funciona como activador transcripcional del operón *luxICDABEG*. Los genes *lux* se regulan mediante la proteína LuxR y el autoinductor. Cuando la densidad celular es baja, la transcripción de ambos promotores es pequeña pero suficiente como para que todas las células tengan cierta concentración de LuxR y LuxI. De esta manera se van sintetizando cantidades pequeñas de autoinductor, y así se va acumulando. Al ir aumentando la densidad celular las concentraciones de autoinductor son cada vez mayores y llega un momento en que se activa la proteína LuxR. Esta se dimeriza y se une a una secuencia palindrómica de 20 pb denominada caja *lux* (promotor P_R) provocando la activación de la transcripción de todos los genes de ese operón con lo que se producirá un gran aumento de la luz emitida. Sin embargo, ese incremento de luz tiene un máximo pues el complejo LuxR-Autoinductor puede regular negativamente la transcripción del promotor P_L dando lugar a una disminución de la proteína LuxR.

Estructura de las AHLs

Las AHLs están formadas por un grupo homoserina lactona (derivado del metabolismo de los aminoácidos a partir de la S-adenosil metionina) unido a una cadena acilo lateral [derivada del metabolismo de ácidos grasos a partir de acil-ACP (acil-proteína transportadora de acilos) o acil-CoA (acil-coenzima A)] (Hanzelka y Greenberg, 1996; Schaefer et al., 1996). La cadena acilo lateral puede tener un sustituyente en el carbono C3 (carbonilo, hidroxilo o totalmente reducido) y una longitud, generalmente, de 4 a 12 carbonos (Hoang et al., 2002; Watson et al., 2002). En algunas especies de *Rhizobium* se han encontrado cadenas laterales de hasta 18 átomos de carbono, y además pueden tener enlaces insaturados (Lithgow et al., 2000; Marketon et al., 2002). La mayoría de los organismos producen más de un tipo de AHL y, además, diferentes organismos pueden sintetizar la misma AHL (Hardman et al., 1998).

Percepción de quórum en bacterias asociadas a organismos eucariotas

En el caso de las bacterias que se asocian a plantas, las AHLs regulan un amplio rango de fenotipos: determinantes de patogenicidad, conjugación, competencia en la rizosfera y producción de metabolitos antifúngicos (Newton y Gray, 2004). Las bacterias productoras de AHLs se encuentran en mayor proporción en las inmediaciones de las raíces de las plantas (rizosfera) que en el resto del suelo, lo que sugiere que las AHLs están relacionadas con la colonización de la rizosfera (Elasri et al., 2001) y con la competencia, probablemente regulando mecanismos tales como la producción de exopolisacárido, la adhesión a la raíz y la formación de la biopelícula (von Bodman et al., 1998; Denny, 1999; de Kievit et al., 2001; Marketon et al., 2003). La percepción de AHLs generalmente está integrada en grandes redes de control con muchas entradas positivas y negativas. Además, parece que algunas plantas pueden ser capaces de interferir y, posiblemente, responder al sistema de señalización de AHLs (Teplitsky et al., 2000; Bauer y Robinson, 2002; Mathesius et al., 2003). Los fenotipos bacterianos controlados por *quorum sensing* frecuentemente están regulados por señales medioambientales adicionales, como la tensión de oxígeno, la falta de nutrientes, la limitación de hierro o la represión por catabolito (Newton y Fray, 2004). Es posible que los compuestos producidos por la planta alteren la respuesta por AHLs indirectamente más que de una manera directa y, aunque fuera así, estos compuestos podrían ser importantes en la determinación del éxito de las interacciones entre las plantas superiores y varias bacterias patógenas y simbióticas. Algunos autores han encontrado imitadores de AHLs derivados de plantas que son capaces de activar débilmente las respuestas por *quorum sensing* (Teplitsky et al., 2000).

Las AHLs pueden provocar varias respuestas específicas en algunos eucariotas, por ejemplo, actuar como quimioatrayentes para el estado de zoospora del alga verde *Enteromorpha* (que se instala preferentemente en biopelículas bacterianas productoras

de AHLs) (Joint et al., 2002). Asimismo se ha visto que la 3-oxo-C₁₂-HSL tiene un efecto inmunomodulador en mamíferos, haciendo que el sistema inmune murino sea menos efectivo frente a las bacterias (Telford et al., 1998). Mathesius et al. (2003) encontraron importantes alteraciones en los perfiles del proteoma de las raíces de *Medicago truncatula* expuestas a niveles fisiológicamente relevantes de AHLs de cadena acilo de 10 o más carbonos, lo que plantea la posibilidad de que algunas plantas respondan directamente a las moléculas señales producidas por microorganismos patógenos o beneficiosos para la planta.

Percepción de quorum en Rhizobium

En la cepa A34 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* la producción de 3-OH-C_{14:1}-HSL (Figura 1.5) está codificada por el gen *cinI* (homólogo de *luxI*), cuya expresión se encuentra regulada por el producto del gen *cinR* (homólogo de *luxR*). Ambos genes, cuya localización es cromosómica (Lithgow et al., 2000), se encuentran en la cima de una cascada que controla la expresión de al menos otras tres AHL sintasas (Rodelas et al., 1999; Lithgow et al., 2000; Wisniewski-Dye et al., 2002). Una de ellas es el producto de *rhiI* que junto con el producto de *rhiR* regula la expresión del operón *rhiABC* (Rodelas et al., 1999; Lithgow et al., 2000). Este operón se expresa en la rizosfera de una manera dependiente de la densidad celular y juega un papel en la nodulación que aún no está completamente elucidado (Cubo et al., 1992).

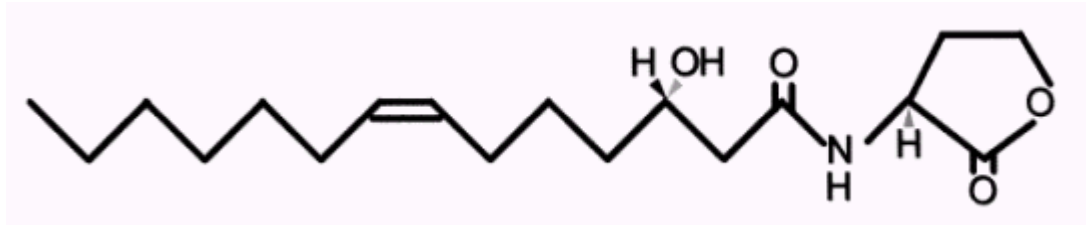


Figura 1.5: Estructura de la *N*-(3*R*-hidroxi-7-*cis*-tetradecanoil)-*L*-homoserina lactona (3-OH-C_{14:1}-HSL) (Gray et al., 1996; Schripsema et al., 1996).

Además de regular la expresión de los genes de la rizosfera, la cascada anteriormente mencionada se encuentra relacionada con la regulación de la transferencia del plásmido conjugativo y probablemente también con la nodulación y la expresión de los genes de adaptación a la fase estacionaria (Rodelas et al., 1999; Thorne y Williams, 1999; Lithgow et al., 2000; Wilkinson et al., 2002; Danino et al., 2003). Esta capacidad de inducir la entrada temprana en fase estacionaria es la responsable del efecto bacteriostático que se atribuyó a la bacteriocina *small* o, lo que es lo mismo, 3-OH-C_{14:1}-HSL (Gray et al., 1996). En la Tabla 1.4 y en la Figura 1.6 se pueden encontrar respectivamente un resumen de los genes responsables de la producción de AHLs y la cascada de regulación por *quorum sensing* en *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

Tabla 1.4: Producción de AHLs en *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. ^a: la identificación de la AHL está basada en los resultados de una cromatografía en capa fina, pero no se ha confirmado por espectrometría de masas o por resonancia magnética nuclear. Adaptada de González y Marketon (2003).

Genes responsables de la producción de AHL	AHLs	Fenómeno regulado	Referencia
<i>rhiR/rhII</i>	C ₆ -HSL C ₇ -HSL C ₈ -HSL	Eficiencia de nodulación	Cubo et al., 1992; Rodelas et al., 1999
<i>raiR/raII</i>	3-OH-C ₈ -HSL C ₆ -HSL C ₇ -HSL C ₈ -HSL	Desconocido	Wisniewski-Dye et al., 2002
<i>traR/traI</i>	3-oxo-C ₈ -HSL ^a C ₈ -HSL ^a	Transferencia de plásmido simbiótico	Wilkinson et al., 2002
<i>cinR/cinI</i>	3-OH-C _{14:1} -HSL	Inhibición de crecimiento	Lithgow et al., 2000

Recientemente se han aislado y secuenciado los genes *cinRI* en una cepa de *Rhizobium etli*. La proteína CinI produce una AHL de estructura no totalmente conocida pero que parece ser diferente a la de la 3-OH-C_{14:1}-HSL, al menos en la ausencia del doble enlace. Esta AHL inhibe el crecimiento de otras cepas de rizobios y se ha demostrado su implicación en la regulación del crecimiento y de la fijación de nitrógeno en *Rhizobium etli* (Daniels et al., 2002). A pesar del parecido existente entre las secuencias de las proteínas CinRI de *Rhizobium leguminosarum* y *R. etli*, estos sistemas basados en el mecanismo percepción de quórum producen distintas moléculas señales y regulan la expresión de fenotipos diferentes en cada especie.

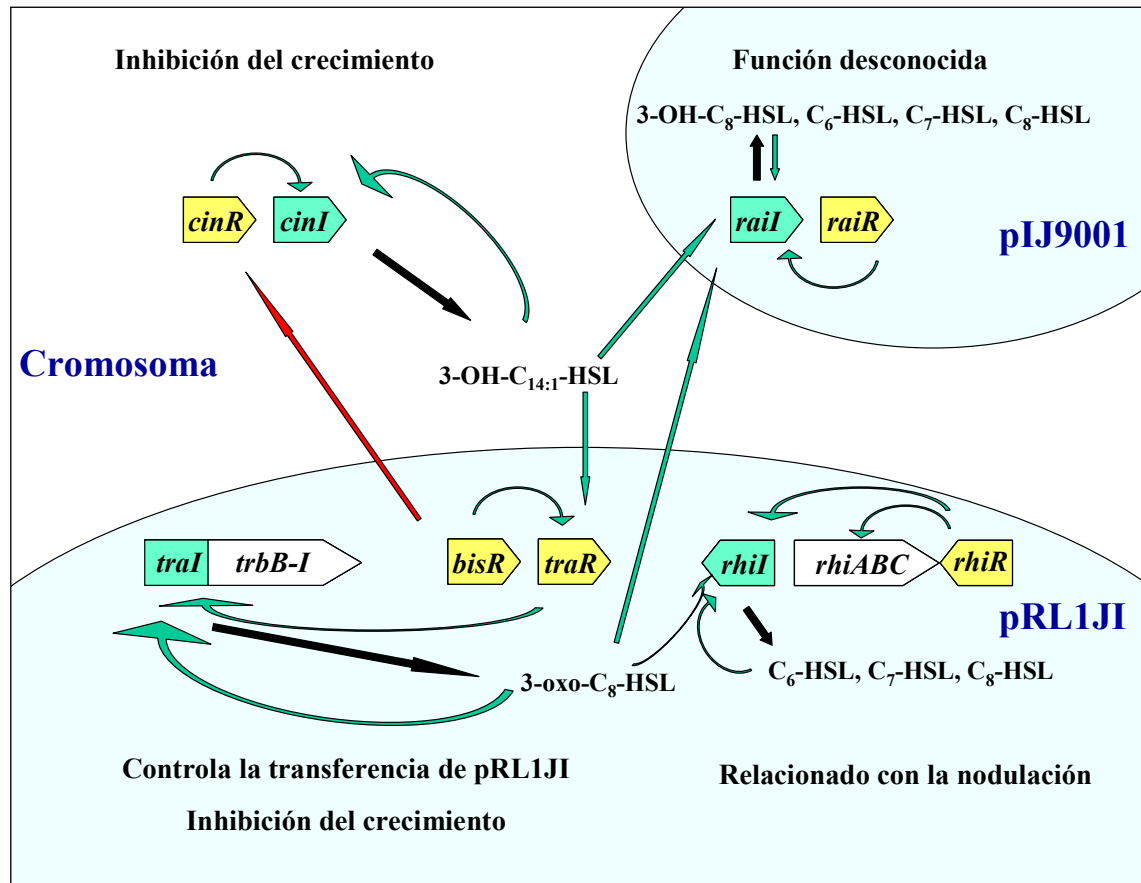


Figura 1.6: Cascada de regulación por *quorum sensing* en *R. leguminosarum* bv. *viciae*. *Rhizobium leguminosarum* tiene cuatro sistemas conocidos de *quorum sensing*. El sistema *cinRI* se encuentra en el cromosoma y produce la $3\text{-OH-C}_{14:1}\text{-HSL}$, que activa los sistemas *tra* y *rai*. La proteína BisR por una parte activa a *traR* y por otra reprime a *cinR* en respuesta a la $3\text{-OH-C}_{14:1}\text{-HSL}$, de manera que enlaza los sistemas *cin* y *tra*. Los sistemas *tra* y *rhi*, así como los genes que confieren la sensibilidad a la inhibición del crecimiento por $3\text{-OH-C}_{14:1}\text{-HSL}$ se encuentran en el plásmido *pRL1JI*, que es el plásmido simbiótico de *R. leguminosarum* bv. *viciae* cepa A34. El sistema *tra* es responsable de producir $3\text{-oxo-C}_8\text{-HSL}$ y controla la transferencia de *pRL1JI*, mientras que el sistema *rhi* produce varias AHLs de cadena corta y tiene influencia en la eficiencia de nodulación por un mecanismo desconocido. El locus *raiRI* se encuentra en el plásmido *pIJ9001* y también produce varias AHLs de cadena corta; sin embargo, se conoce muy poco acerca del papel de este sistema de *quorum sensing*. Las flechas verdes indican activación y la flecha roja represión. *trbB-I* corresponde a los genes *trbBCDEJKLFGHI*. Adaptada de González y Marketon (2003).

1.2.3.2. Trifolitoxina

La cepa T24 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* se aisló a partir de los nódulos de las raíces de *Trifolium dubium* en 1937 y se observó que poseía unas características muy interesantes: los nódulos producidos por esta cepa no fijaban nitrógeno y por otra parte era capaz de inhibir la nodulación por otras cepas de rizobios (Schwinghamer y Belkengren, 1968). Esta última característica es consecuencia de la producción de una bacteriocina denominada trifolitoxina (Triplett y Barta, 1987). Esta bacteriocina resulta de gran interés pues hoy en día es una de las rizobiocinas mejor caracterizadas gracias al trabajo del grupo de investigación de E.W. Triplett.

La trifolitoxina es un pequeño péptido lineal modificado de 1.037 Da. La secuencia de aminoácidos es DIGGSRXGCVA, donde la X es un grupo cromóforo resultante de la ciclación post-traducciona del aminoácido glutamina (Breil y Triplett, 1993).

A bajas concentraciones el efecto bacteriostático de la trifolitoxina se encuentra restringido a las cepas de *Sinorhizobium fredii* y a las de las tres biovariedades de *Rhizobium leguminosarum*, mientras que no afecta a otras bacterias comunes del suelo y de la rizosfera (Schwinghamer y Belkengren, 1968; Triplett y Barta, 1987). Sin embargo al emplear concentraciones superiores el espectro de actuación se amplía a cepas de *Sinorhizobium meliloti* (Triplett y Vogelzang, 1989), *Agrobacterium*, *Brucella*, *Mycoplasma*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas* y *Rhodospirillum* (Triplett et al., 1994).

Los genes responsables de la producción de la trifolitoxina y la resistencia a ella son siete: *tfxABCDEFG*, y se transcriben en el mismo sentido (Breil et al., 1993). El gen *tfxA* es el gen estructural putativo de la trifolitoxina y su producto es una proteína de 42

aminoácidos que tras un corte en la posición 31 da lugar a un propéptido de 11 aminoácidos. Los genes *tfxBCD* parece que están relacionados con la modificación y transporte del esqueleto peptídico y el transporte de la propia trifolitoxina. El gen relacionado con la resistencia parece ser *tfxE*, mientras que *tfxG* está relacionado con la formación de isómeros de trifolitoxina (Scupham et al., 2002). Fuera de la región *tfx* se ha aislado el gen *tfuA*, cuyo producto resulta esencial para la producción de la trifolitoxina aunque se desconoce su papel exacto. Al lado de *tfuA* en 5' se encuentra un marco abierto de lectura denominado ORF2 que podría estar relacionado con la ciclación post-traducciona del propéptido (Breil et al., 1996).

La cepa T24, a pesar de ser muy competitiva gracias a la trifolitoxina, no es útil como inoculante pues es incapaz de fijar nitrógeno en simbiosis con especies de *Trifolium* (Triplett y Barta, 1987). Se han conseguido cepas altamente competitivas mediante la inserción de los genes *tfx* de forma estable en el genoma de la cepa TA1 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (Triplett, 1990). Además, en la cepa CE3 de *Rhizobium etli* se ha introducido un plásmido estable que confiere la producción de la trifolitoxina (pT2TFXK) y se ha comprobado que esta cepa resulta muy competitiva en estudios realizados bajo condiciones controladas y en estudios de campo, sin que aparezca ningún efecto negativo en el rendimiento de la planta (Robleto et al., 1997, 1998), y a pesar de que la trifolitoxina se degrada rápidamente cuando es producida y secretada en suelos no estériles (Bosworth et al., 1993). Otra posible aplicación de la trifolitoxina es el control biológico de la producción de tumores (agallas en corona) por cepas patógenas de *Agrobacterium vitis* mediante la introducción de los genes de producción y resistencia a la trifolitoxina (pT2TFXK) en la cepa no patógena F2/5 de *A. vitis* (Herlache y Triplett, 2002). Una revisión acerca de la trifolitoxina se puede encontrar en Rodelas et al. (2002).

1.2.4. Bacteriocinas de tipo medio (*medium*): toxinas RTX

1.2.4.1. Toxinas RTX

Las proteínas RTX (*Repeats in ToXin*) son una familia de proteínas sintetizadas por bacterias Gram-negativas que son secretadas por el sistema de transporte de tipo I y le deben su nombre a la presencia de repeticiones de unión a calcio. Las funciones de estas proteínas van desde hidrolasas hasta toxinas, aunque se desconoce la función de muchas de ellas (Delepelaire, 2004). Como ejemplos tenemos factores de virulencia de bacterias patógenas (hemolisinas, leucotoxinas...) (Lally et al., 1999) que serían las toxinas RTX propiamente dichas (Tabla 1.5), pero también se han descrito proteínas RTX con actividad proteasa, lipasa, bacteriocina, de unión a grupo hemo (de Maagd et al., 1989; Akatsuka et al., 1997), e incluso una proteína RTX que interviene en el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa (NodO de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*) (Economou et al., 1990).

Las proteínas con repeticiones de unión a calcio solo se han encontrado hasta ahora en cianobacterias y en todas las clases de proteobacterias. Se pueden hacer varios comentarios de estas proteínas (Delepelaire, 2004):

- a) Tienen un tamaño que va desde 78 a 8682 aminoácidos.
- b) Todas, con una única excepción, son proteínas muy ácidas con un pI de aproximadamente 4.
- c) Un pequeño número de especies presenta un número excepcional de candidatos como, por ejemplo, *Bradyrhizobium japonicum*, *Nostoc*, *Ralstonia solanacearum*, *Sinorhizobium meliloti* y *Synechococcus*.
- d) Contienen muy pocas o ninguna cisteína, con una sola excepción.

- e) Muchas proteínas además de las repeticiones de unión a calcio tienen otro tipo de repeticiones que a menudo están asociadas por homología con moléculas de adhesión.

Las toxinas RTX se caracterizan por presentar diferencias en su actividad citotóxica frente a diferentes hospedadores y tipos celulares. Se podrían distinguir tres grupos funcionales: hemolisinas, leucotoxinas y citotoxinas. Las hemolisinas son activas frente a diversos tipos celulares (eritrocitos, leucocitos...) (Cavalieri y Snyder, 1982; Keane et al., 1987; Lalonde et al., 1989; Suttorp et al., 1990) provenientes de una amplia variedad de especies, incluyendo a humanos y rumiantes. Las leucotoxinas tienen un espectro de citotoxicidad más reducido ya que atacan únicamente a leucocitos de grupos filogenéticamente muy relacionados (por ejemplo, rumiantes o primates) (Shewen y Wilkie, 1982; Taichman et al., 1987). Las citotoxinas actúan frente a un espectro más amplio de células o especies que las leucotoxinas, pero presentan unos límites más claros en su actividad que las hemolisinas (Frey, 1995; Bauer y Welch, 1996).

Tabla 1.5: Ejemplos de toxinas RTX, especies bacterianas que las producen y organización genética. El operón de las toxinas RTX consta generalmente de los genes CABD en dirección 5'-3', mientras que el gen *tolC* normalmente se encuentra separado del operón. ^a: carece de los genes de transporte y parece que aprovecharía el sistema de transporte de ApxI. ^b: carece de genes de transporte, y en posición 5' con respecto a *A* se ha encontrado el gen *orfI* cuyo producto no tiene similitud con ninguna proteína conocida y que parece estar relacionado con la actividad de A. ^c: todos los genes están en el mismo locus, aunque *C* se transcribe en sentido contrario al resto y *E* es un homólogo de *tolC*. ^d: todos los genes están en el mismo locus, pero el operón *orfICA* se transcribe en sentido contrario al operón *BDE*; *orfI* codifica para una proteína hipotética y *E* forma parte del sistema de transporte como una segunda proteína ABC aparte de B. ^{¿?}: desconocido.

Toxina	Bacteria	Estructura del operon	Referencias
ApxIA	<i>Actinobacillus lignieresii</i> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> <i>Actinobacillus suis</i>	CABD	Frey et al., 1994
ApxIIA	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> <i>Actinobacillus rossii</i> <i>Actinobacillus suis</i> <i>Actinobacillus</i> spp.	CA ^a	Chang et al., 1989
ApxIIIA	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> <i>Actinobacillus rossii</i>	CABD	Chang et al., 1993b
ApxIVA	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>orfIA</i> ^b	Schaller et al., 1999
AqxA	<i>Actinobacillus equuli</i>	CABD	Berthoud et al., 2002
CyaA	<i>Bordetella bronchiseptica</i> <i>Bordetella pertussis</i>	C</>ABDE ^c	Betsou et al., 1995 Glaser et al., 1988
EhxA	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágico	CABD	Bauer y Welch, 1996
FrpA	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>orfIA</i> ^b	Thompson et al., 1993a
FrpC	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>orfIC</i> ^b	Thompson et al., 1993b
HlyA	<i>Escherichia coli</i> uropatogénico	CABD	Felmlee et al., 1985
LktA	<i>Mannheimia haemolytica</i>	CABD	Chang et al., 1987; Lo et al., 1987
LtxA	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	CABD	Lally et al., 1989; Kraig et al., 1990
MbxA	<i>Moraxella bovis</i>	CABD	Gray et al., 1995; Angelos et al., 2001
MmxA	<i>Morganella morganii</i>	¿?	Koronakis et al., 1987; Welch, 1987
PaxA	<i>Pasteurella aerogenes</i> <i>Pasteurella mairi</i>	CABD	Kuhnert et al., 2000
PlkTA	<i>Mannheimia varigena</i>	CABD	Chang et al., 1993a
PvxA	<i>Proteus vulgaris</i>	¿?	Koronakis et al., 1987; Welch, 1987
RtxA	<i>Vibrio cholerae</i>	ACorfl</>BDE ^d	Lin et al., 1999; Boardman y Satchell, 2004

1.2.4.2. Estructura genética

El operón que codifica la expresión de las toxinas RTX consta generalmente de cuatro genes: *rtxCABD* en orden transcripcional (Figura 1.7). Para que las toxinas RTX sean activas requieren una modificación post-traducciona que consiste en la acilación del producto del gen estructural *rtxA* por parte del producto del gen *rtxC*, junto con una proteína transportadora de acilos (ACP). Las toxinas RTX carecen de péptidos señal en el extremo amino terminal y son transportadas al exterior gracias a unas proteínas de transporte codificadas por *rtxB* y *rtxD* (Lally et al., 1999).

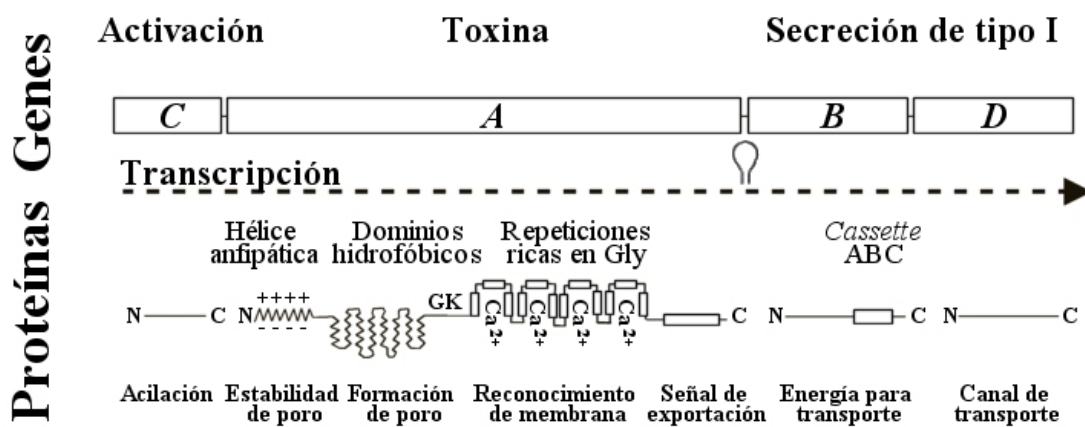


Figura 1.7: Organización genética y estructura de las toxinas RTX. Esta ilustración representa la organización genética y estructural más común de las toxinas RTX, y está basada fundamentalmente en la hemolisina HlyA de *Escherichia coli*. En la parte de arriba aparece la organización genética de las toxinas RTX. Los genes *C*, *A*, *B* y *D* codifican el activador, la protoxina y la maquinaria de secreción respectivamente. La flecha muestra la dirección de transcripción y la señal de terminación de la transcripción independiente de *rho* entre los genes *A* y *B* está indicada con una horquilla. Los productos de los genes con sus principales características estructurales están representados debajo de sus correspondientes genes. Se han indicado los dominios de la toxina RtxA y algunas de las funciones propuestas (se comentan con más detalle en el texto). GK representa el sitio o sitios de acilación glicina-lisina. ABC: *ATP-binding cassette*. N: extremo amino terminal. C: extremo carboxilo terminal. Adaptada de Frey y Kuhnert (2002).

1.2.4.3. RtxC

Como modelo de proteína RtxC se puede hablar de la proteína HlyC de *Escherichia coli*. La proteína HlyA se sintetiza como una protoxina inactiva (pro-HlyA) de 1.024 residuos, que se activa intracelularmente mediante la acción de la proteína HlyC. Usando un sistema *in vitro* se ha visto que la maduración consiste en una acilación con ácidos grasos, y que HlyC es una aciltransferasa putativa homodimérica que emplea acil-ACP (acil-proteína transportadora de acilos) como donadora de ácidos grasos (Hardie et al., 1991; Issartel et al., 1991; Hughes et al., 1992a, 1992b; Stanley et al., 1994, 1996). La acilación se lleva a cabo en dos lisinas internas de HlyA (K564 y K690) y el enlace parece ser de tipo amida. Estas dos lisinas son los únicos sitios de acilación, lo que se demuestra con una sustitución de estas lisinas, y es necesario que ambas estén aciladas para que la toxina tenga actividad hemolítica (Stanley et al., 1994).

La habilidad de transferir un grupo acilo a residuos internos de lisina de una determinada proteína distingue a HlyC de todas las demás aciltransferasas bacterianas. Además las cepas *hlyA⁺ hlyC⁻* no son hemolíticas, lo que indica que las aciltransferasas constitutivas de *E. coli* no son capaces de sustituir a HlyC ni siquiera en pequeña medida. Asimismo, HlyC no presenta homología de secuencia con otras aciltransferasas conocidas como las aciltransferasas del lípido A (Anderson y Raetz, 1987; Coleman y Raetz, 1988; Kelly et al., 1993; Clementz et al., 1997), las aciltransferasas de factores Nod de *Rhizobium* NodL y NodA (Bloemberg et al., 1995; Debelle et al., 1996), o aciltransferasas bien caracterizadas tales como las glicerol-3-fosfato aciltransferasas (Lightner et al., 1983) o *N*-miristoiltransferasas eucarióticas (Johnson et al., 1994; Zhang et al., 1996b). Por lo tanto, HlyC parece ser una aciltransferasa diferente de las demás desde el punto de vista estructural y funcional (Stanley et al., 1998).

No se conoce mucho acerca de las propiedades bioquímicas de HlyC. Las aciltransferasas bacterianas y eucariotas generalmente emplean tanto acil-CoA (acil coenzima A) como acil-ACP como donador de grupos acilo, pero en el caso de HlyC la proteína transportadora de acilos es un requerimiento indispensable (Stanley et al., 1998). La máxima actividad hemolítica de HlyA se consigue con miristoil-ACP dentro de un rango de ácidos grasos que va desde C₁₂ a C_{18:1} (Issartel et al., 1991), lo que concuerda con la aparente selección de grupos miristoilo (C₁₄) en la acilación de las lisinas *in vitro* (Stanley et al., 1998). Sin embargo, HlyC no sólo es capaz de discriminar entre acil-ACPs con ácidos grasos de diferente longitud, sino que parece ser que lo puede hacer a muy baja concentración de sustrato, ya que *E. coli* no posee cantidades significativas de acil-ACPs con ácidos grasos de más de tres carbonos (Rock y Jackowski, 1982). HlyC puede unir de forma fuerte pero parece que no de manera covalente tanto la cadena de ácido graso de acil-ACP como la fosfopanteteína, aunque aún se desconocen las localizaciones del sitio activo y de las regiones de unión a los sustratos acil-ACP y pro-HlyA (Stanley et al., 1998).

Se han descrito en la protoxina pro-HlyA dos dominios de reconocimiento por HlyC, cada uno de los cuales abarca los residuos de lisina K564 y K690 respectivamente (Stanley et al., 1996). Cada dominio requiere de 15 a 30 aminoácidos para un reconocimiento basal y de 50 a 80 aminoácidos para una acilación completa. Estas secuencias de reconocimiento parecen ser mayores que las de otras aciltransferasas, que pueden reconocer secuencias de 4 a 15 aminoácidos (Stanley et al., 1998). Además en estos casos los sitios de modificación están en los extremos amino o carboxilo de la proteína, por lo que resultan muy accesibles. Por el contrario, los sitios de acilación interna de HlyA hacen que HlyC deba reconocer una topología mayor más que una secuencia lineal. Los dos dominios son funcionalmente indistinguibles y compiten entre sí por HlyC tanto en *cis* como en *trans*. Para la maduración de la proteína no se requieren otras secuencias de HlyA, ni siquiera las repeticiones de unión

a calcio que están a continuación en posición carboxilo terminal (aminoácidos 772 a 849). De hecho, los iones calcio evitan la acilación de las lisinas (Stanley et al., 1996), y esto concuerda con el hecho de que los niveles de calcio intracelulares en *E. coli* son demasiado bajos para afectar a la actividad de la toxina (Gangola y Rosen, 1987) y con que la unión de calcio se produce una vez que la toxina está fuera de la célula.

Los sitios de reconocimiento de HlyA por HlyC se han comparado entre sí y con otros miembros de la familia de toxinas y la homología es pequeña. Lo único que tienen en común las secuencias consenso de los dos sitios de acilación es el motivo “GK”, lo que sugiere que la similitud entre ambos sitios puede ser de orden estructural. Las predicciones de estructura secundaria indican que ambas regiones son ricas en giros β que están espaciados de manera bastante regular aproximadamente cada 10 aminoácidos, principalmente en el primer dominio (Stanley et al., 1998).

1.2.4.4. Proteínas transportadoras de toxinas RTX

El sistema de transporte de tipo I, también conocido como sistema de transporte ABC (*ATP binding cassette*), es el responsable de la translocación de la mayoría de las proteínas con repeticiones de unión a calcio ricas en glicina (como las toxinas RTX), así como de proteínas que no tienen ningún tipo de repeticiones y de proteínas que poseen diferentes tipos de repeticiones, aparte de las de unión a calcio (Delepelaire, 2004).

El sistema de transporte de tipo I es independiente del sistema Sec (Young y Holland, 1999), y es responsable de la translocación de proteínas desde el citoplasma hasta el espacio extracelular en un único paso, sin un intermedio periplásmico estable. La secreción se consigue gracias a un complejo transportador que abarca ambas membranas y el espacio periplásmico intermedio. Este complejo está formado por tres proteínas: una proteína transportadora ABC, una proteína de fusión de membrana (MFP,

membrane fusion protein) y una proteína de membrana externa (OMP, *outer membrane protein*). La señal de secreción normalmente se encuentra en el extremo carboxilo terminal de la proteína a transportar y no se procesa durante la secreción (Delepelaire, 2004).

Proteínas transportadoras de HlyA

El prototipo de los transportadores de toxinas RTX y el mejor caracterizado con diferencia es el transportador Hly de la α -hemolisina de *Escherichia coli* (Felmlee et al., 1985; Mackman et al., 1986; Gentshev et al., 2002). Este transportador se compone de HlyB (proteína ABC), HlyD (proteína de fusión de membrana) y TolC (proteína de membrana externa multifuncional de *E. coli* codificada por el gen *tolC* de localización cromosómica) (Wandersman y Delepelaire, 1990) (Figura 1.8). En la mayoría de los casos los operones y los *cluster* de genes que codifican para las toxinas RTX incluyen los genes de las maquinarias de secreción.

HlyB pertenece a la superfamilia ABC de proteínas de transporte procariotas y eucariotas (Holland y Blight, 1999; Saurin et al., 1999). Las proteínas ABC del sistema de transporte de tipo I están formadas por un dominio de unión a nucleótidos (NBD: *nucleotide binding domain*) y por un dominio transmembrana (TMD: *transmembrane domain*), y se piensa que funcionan como homodímeros. La secuencia primaria de los NBDs está más conservada que la de los dominios transmembrana, lo que apoya la hipótesis de que la especificidad la proporcionan los TMDs (Delepelaire, 2004). Los NBDs contienen los motivos Walker A (*P-loop* o bucle de unión a fosfato) y Walker B (sitio de unión a magnesio) separados por 90-120 aminoácidos, los cuales se encuentran en todas las proteínas de unión a ATP. Las proteínas ABC además poseen un motivo C distintivo (*signature*), en posición amino terminal con respecto al motivo Walker B. Los NBDs están localizados en el citoplasma y son responsables de unir e hidrolizar ATP,

de manera que acoplan la hidrólisis de ATP con el transporte del sustrato a través de la membrana. Los TMDs están formados por 6-11 hélices α transmembrana localizadas en la membrana interna (Dean et al., 2001). En el caso de HlyB parece ser que esta proteína se inserta en la membrana interna mediante ocho hélices α transmembrana hidrofóbicas. Estas hélices transmembrana se extienden desde el aminoácido 38 al 432 de HlyB. Los bucles citoplasmáticos entre las hélices transmembrana son relativamente grandes y poseen un exceso de aminoácidos cargados positivamente, mientras que los bucles periplásmicos son bastante pequeños. Es interesante el hecho de que las dos primeras hélices transmembrana puedan ser eliminadas sin que por ello quede afectada la secreción de la hemolisina (Gentshev et al., 2002).

HlyD es uno de los miembros mejor caracterizado de la familia de proteínas de fusión de membrana (MFP) (Dinh et al., 1994). Las MFP son proteínas de transporte accesorias que funcionan en conjunción con transportadores de membrana. Las MFPs están formadas por un corto dominio amino terminal citoplasmático, un dominio transmembrana hidrofóbico que ancla la proteína a la membrana interna y un gran dominio periplásmico hidrofílico que interactúa con la proteína de membrana externa (Hahn y von Specht, 2003). El dominio periplásmico de HlyD coincide con los últimos 100 aminoácidos del extremo carboxilo terminal, los cuales están muy conservados en la familia MFP (Schülein et al., 1992). El análisis de la secuencia primaria de HlyD ha mostrado una gran propensión de esta proteína a formar estructuras *coiled-coil* y polímeros (Delepelaire, 2004). De hecho, HlyD probablemente es un trímero como TolC (Thanabalu et al., 1998).

TolC es una proteína de membrana externa (OMP) general (Paulsen et al., 1997), la cual forma parte de cuatro sistemas de transporte diferentes (Zgurskaya y Nikaido, 2000). La estructura cristalina de TolC consiste en un trímero de la proteína que forma un túnel-canal trans-periplásmico de 35 Å de diámetro y 140 Å de largo. El dominio

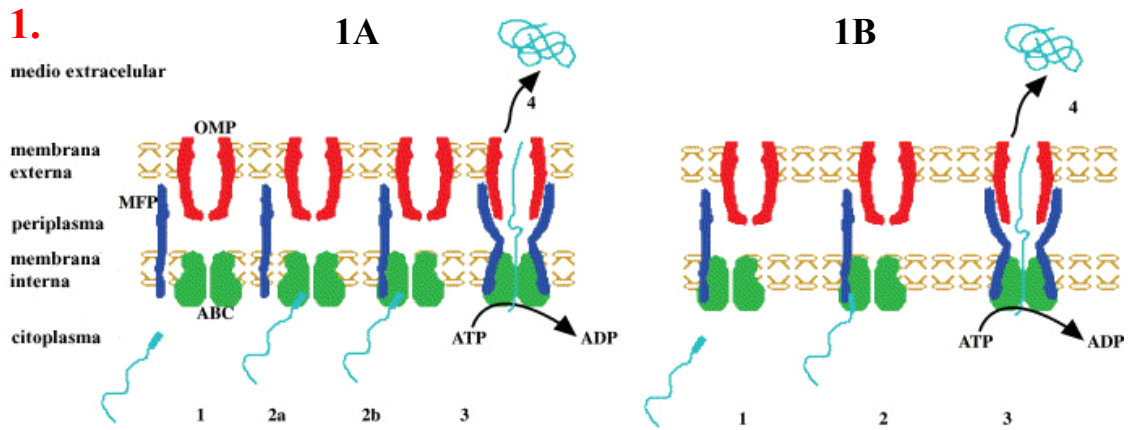
canal consiste en un barril β de 40 Å de largo situado en la membrana externa. Este se encuentra unido al dominio túnel contiguo, un barril α -helicoidal de 100 Å de largo que se extiende a través del espacio periplásmico (Koronakis et al., 2000; Andersen et al., 2001). El extremo periplásmico de TolC se estrecha desde un diámetro interno de 30 Å hasta estar casi totalmente cerrado, de manera que se evita la entrada de una molécula de HlyA incluso sin plegar (Holland, 2004). Cada monómero está formado por dos mitades similares, probablemente resultantes de un fenómeno de duplicación, y aporta cuatro hojas β en la membrana externa y cuatro hélices α en el periplasma. Existen estudios genéticos que apoyan la idea de que la apertura del extremo cerrado de TolC requiere un movimiento de tipo diafragma o tipo iris de las hélices de TolC (Holland, 2004), concretamente mediante el desenrollamiento de las estructuras *coiled coil* que forman el tercio distal del dominio periplásmico (Delepelaire, 2004). En *Escherichia coli* y otros muchos patógenos, la proteína TolC está codificada por un gen que está separado del operón *hly*, pero en *Bordetella pertussis* el *locus* de la toxina incluye *tolC* (*cyaE*) (Stanley et al., 1998).

Las señales de secreción de tipo I se encuentran en los últimos 24-80 aminoácidos del extremo carboxilo terminal (Koronakis et al., 1989a; Jarchau et al., 1994; Sutton et al., 1996), y en el caso de HlyA se trata de los últimos 50-60 aminoácidos (Koronakis et al., 1989a; Holland et al., 1990; Jarchau et al., 1994). El hecho de que la señal de secreción esté en el extremo carboxilo terminal implica que la proteína tiene que ser totalmente sintetizada antes de que pueda interactuar con el sistema de transporte de tipo I, pero sigue sin estar clara la naturaleza de esta señal (Holland, 2004).

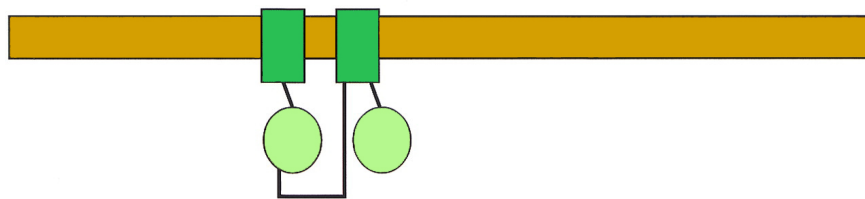
En la revisión de Delepelaire (2004) acerca del sistema de transporte de tipo I se llega a la conclusión de que las proteínas plegadas no pueden ser transportadas, lo que implica la existencia de mecanismos que aseguren la presentación de las moléculas sin

plegar al transportador. Una forma de evitar el plegamiento prematuro es el uso de chaperonas, como es el caso de SecB en la secreción de la proteína HasA, aunque no está claro si se trata de un caso general. En particular, las repeticiones de unión a calcio (ausentes en HasA) generalmente juegan un papel en la secreción, ya que mejoran la secreción de proteínas quiméricas (Letoffe y Wandersman, 1992) y son necesarias para la total actividad de la proteína secretada. Por lo tanto, una hipótesis sería que las repeticiones RTX podrían actuar como chaperonas intramoleculares (Delepelaire, 2004).

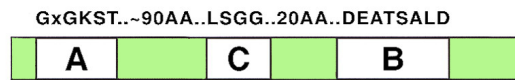
Algunos estudios sugieren que los polipéptidos transportados por el sistema de transporte de tipo I, como HlyA, empiezan a plegarse dentro del túnel formado por HlyD y TolC, ya que mutaciones específicas en alguna de estas proteínas afectan al plegamiento correcto de la toxina secretada. Además, puede ser que la unión de calcio a las repeticiones RTX facilite el plegamiento de los polipéptidos, estando también implicada la señal de secreción carboxilo terminal de HlyA (Holland, 2004).



2. 2A



2B



3.

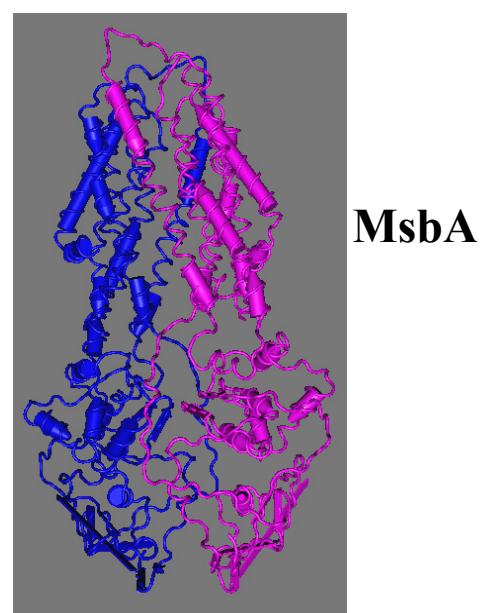
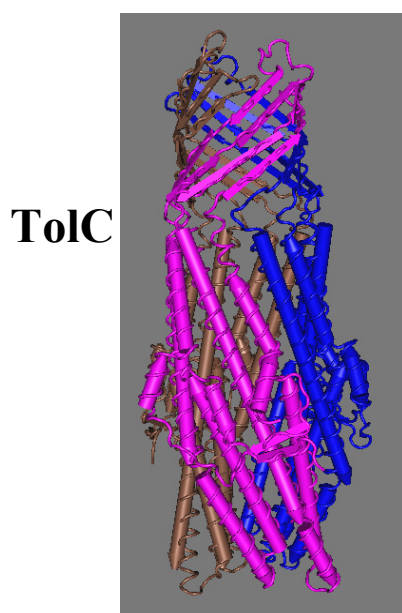


Figura 1.8: 1 Modelo del sistema de transporte de tipo I con el complejo ABC/MFP sin preformar (1A) o preformado (1B). El modelo pretende llamar la atención sobre el ensamblaje del complejo de secreción gracias a la señal de secreción carboxilo terminal. El paso en el que ocurre la hidrólisis de ATP es especulativo al igual que lo es la estequiometría de los diferentes componentes. Adaptada de Delepelaire (2004). 2 Diagrama de un transportador ABC típico. 2A Se muestra el diagrama de la estructura de una proteína ABC representativa con la bicapa lipídica en amarillo, los dominios transmembrana en verde oscuro y los dominios de unión a nucleótidos en verde claro. 2B El dominio de unión a nucleótidos de una proteína ABC contiene los motivos Walker A y B que se encuentran en todas las proteínas de unión a ATP. Además, también existe un motivo distintivo C. Los aminoácidos más comunes encontrados en estos motivos se muestran encima del diagrama. Adaptada de Dean et al. (2001). 3 Diagrama de la proteína TolC de *Escherichia coli* y la proteína ABC MsbA de *Vibrio cholerae* que tiene homología con las proteínas ABC del sistema de secreción de tipo I. Cada monómero está coloreado de un color.

1.2.4.5. Repeticiones de las proteínas RtxA

Las proteínas RtxA se caracterizan por tener repeticiones en tándem de un nonapéptido rico en glicina cuya secuencia consenso es GGXGXDX(L/I/V/W/Y/F)X, donde X representa cualquier aminoácido (Lally et al., 1999). La demostración de que estas repeticiones son responsables de la unión a calcio ayudó a explicar la observación previa de que la hemólisis o la citotoxicidad de las toxinas RTX es dependiente de calcio (Short y Kurtz, 1971; Boehm et al., 1990a, b; Hewlett et al., 1991). El motivo GGXGXD es un dominio de unión a calcio cuyo papel exacto no está claro, aunque se han sugerido varias funciones (Michiels et al., 2002). El número de veces que se repite la secuencia consenso va desde seis hasta cuarenta según la proteína RTX (Lally et al., 1999).

La estructura secundaria y terciaria definitiva de los dominios de repetición necesita un estudio más profundo, pero por analogía con la proteasa alcalina RTX de *Pseudomonas aeruginosa* es probable que estas repeticiones den lugar a una estructura de hélice β paralela (o rollo β paralelo) alargada, en la que los seis primeros residuos de cada motivo forman un giro al que se une un ion calcio y los tres residuos restantes constituyen una cadena β corta. Las cadenas β consecutivas están conectadas de manera

que se forma una espiral o hélice a derechas de cadenas β paralelas (Baumann et al., 1993). Así, una vuelta de esta hélice la conforman dos motivos nonapeptídicos consecutivos (Figura 1.9). Los iones de calcio internos mantienen unido el sándwich de cadenas β , y el dominio proteasa amino terminal permanece empaquetado sobre la parte superior de una de las caras del dominio sándwich. A partir de la estructura cristalina resuelta y del alineamiento de las repeticiones de unión a calcio se ha llegado a la conclusión de que las repeticiones que son exactamente iguales que la secuencia consenso forman la zona central altamente regular y ordenada de la hélice β paralela, mientras las repeticiones que son aproximadamente iguales forman los bordes deshilachados de la misma. Esto ocurre porque los iones calcio están unidos con menos fuerza a las repeticiones imperfectas que a las repeticiones perfectas y, de hecho, en estos lugares existen moléculas de H_2O que actúan como ligandos de los iones calcio en vez de aminoácidos (Welch, 2001). Asimismo, sólo se pueden eliminar iones de calcio en condiciones nativas con EGTA u otros agentes quelantes cuando se trata del calcio situado en los bordes deshilachados de la hélice α , los cuales están expuestos al disolvente (Lilie et al., 2000).

Al igual que la proteasa alcalina RTX, las toxinas RTX poseen repeticiones que son exactamente iguales que la secuencia consenso. Al llevar a cabo alineamientos múltiples de secuencias de toxinas RTX (con la excepción de RtxA de *Vibrio cholerae*), se pueden observar tres repeticiones aproximadas en tándem en posición amino terminal con respecto a una gran serie de repeticiones en tándem. Dentro de esta gran serie de repeticiones, las dos primeras son versiones aproximadas (con la excepción de EhxA) y además aparecen múltiples copias exactas casi siempre en tándem (Welch, 2001).

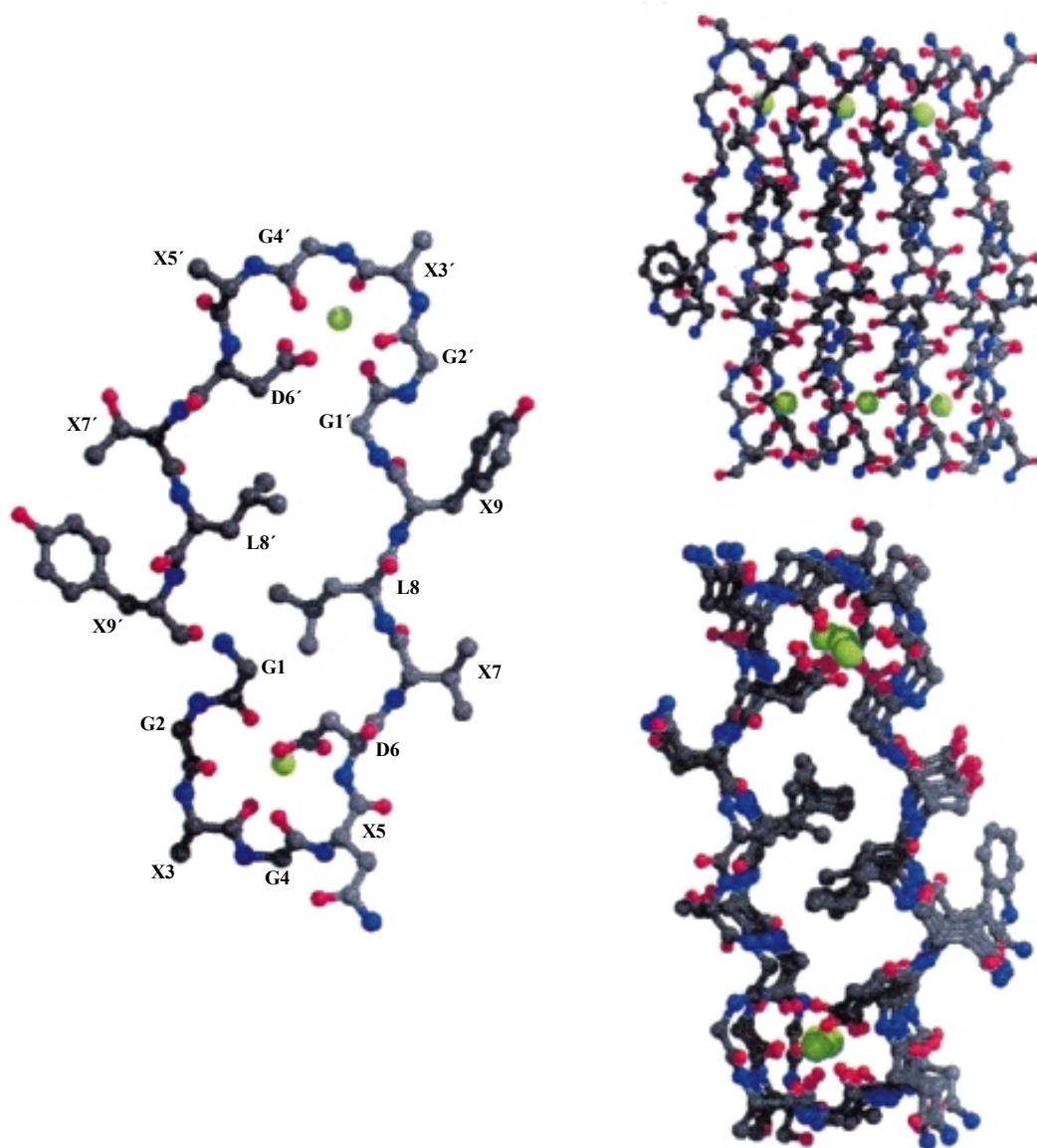


Figura 1.9: Hélice β paralela. A la izquierda se puede ver una vuelta de la hélice. Los residuos del primer motivo de nueve aminoácidos se han denominado G1, G2... mientras que los del segundo motivo se han nombrado como G1', G2'... A la derecha se pueden apreciar dos vistas ortogonales de la hélice β paralela de la proteasa alcalina de *Pseudomonas aeruginosa*. Los iones calcio están representados como esferas verdes. Adaptada de Lilie et al. (2000).

1.2.4.6. Detalles estructurales de las proteínas RtxA

Punto isoeléctrico

Además de las repeticiones de unión a calcio, las toxinas RTX poseen otras características químicas y estructurales comunes. Los puntos isoeléctricos predichos para las toxinas RTX generalmente son ácidos, con la excepción de la toxina LtxA de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cuyo pI es de 8,9. En general, predominan los aminoácidos con carga positiva en las secuencias polipeptídicas del tercio amino terminal (<950 aminoácidos) (Felmlee et al., 1985; Lo et al., 1987; Kraig et al., 1990). Por lo tanto, para conseguir un pI global de carácter ácido debe existir una preponderancia de aminoácidos cargados negativamente en el tercio distal de los polipéptidos. No se conoce la importancia de esta propiedad química, pero existe un modelo en el que se especula que la porción amino terminal de las toxinas RTX (cargada positivamente) inicia el contacto con la célula mediante una interacción iónica con la membrana plasmática (cargada negativamente) (Welch, 2001).

Región amino terminal

La secuencia de estas toxinas presenta una mayor divergencia en la región amino terminal, pero no se ha encontrado que las diferencias en la secuencia tengan importancia desde el punto de vista funcional (Welch, 1995). Además, las proteínas mutantes de HlyA con deleciones en las posiciones 9-37 presentan una actividad eritrolítica elevada al compararlas con la proteína silvestre HlyA (Ludwig et al., 1991). El motivo de esta elevada actividad sigue sin conocerse.

Región rica en aminoácidos hidrofóbicos

Se ha especulado mucho acerca de la función de la región rica en aminoácidos hidrofóbicos que va aproximadamente desde el residuo 200 al residuo 450. La hipótesis original es que esta región forma hélices α transmembrana que dan lugar a un poro en la membrana plasmática, siendo éste el responsable de los mecanismos citotóxicos primarios (Felmlee et al., 1985; Oropeza-Wekerle et al., 1992). Existe una hipótesis alternativa que defiende que en las toxinas RTX existen diez hélices α anfipáticas y seis de ellas se encuentran entre los residuos 200 y 450 (Soloaga et al., 1999). Estas hélices anfipáticas se insertarían en la bicapa lipídica, pero sin atravesarla, de manera que se produciría el desplazamiento de los fosfolípidos dentro de una de las dos capas de la membrana. El resultado sería la desestabilización de la bicapa por una actividad de tipo pseudo-poro (Welch, 2001).

Región con sitios de acilación por RtxC

Al realizar alineamientos múltiples de toxinas RTX (excluyendo a las toxinas más divergentes desde el punto de vista evolutivo: CyaA de *Bordetella pertussis* y RtxA de *Vibrio cholerae*) se puede observar que la zona que va desde el aminoácido 450 al 700, y que se encuentra entre la región rica en residuos hidrofóbicos y las repeticiones de unión a calcio, está menos conservada en las toxinas RTX que las regiones vecinas (Welch, 1995). Esta falta de conservación es especialmente evidente cuando se comparan las hemolisinas con las leucotoxinas. Sin embargo, el hecho de que el producto del gen *rtxA* debe ser modificado para tener actividad es común a todas las toxinas RTX (Nicaud et al., 1985), y los sitios de modificación de las toxinas HlyA de *Escherichia coli* y CyaA de *Bordetella pertussis* se encuentran en esta zona (Issartel et al., 1991; Hackett et al., 1994; Rowe et al., 1994; Lim et al., 2000). Los requerimientos locales de la secuencia necesarios para la modificación parecen ser mínimos (Hackett et

al., 1994; Pellett y Welch, 1996; Stanley et al., 1996). Se modifican dos residuos de lisina con un ácido graso cada uno, y lo único que tienen en común todos los sitios de modificación conocidos es que existe un residuo de glicina en posición amino terminal con respecto a la lisina. Parece ser que existe una pequeña hélice α justo en posición amino terminal con respecto a la lisina modificada (Hackett et al., 1994; Pellett y Welch, 1996; Stanley et al., 1996).

Región carboxilo terminal

La señal de secreción extracelular, que es reconocida por la maquinaria de exportación, se encuentra en los últimos 60 aminoácidos del extremo carboxilo terminal en lugar de estar en el extremo amino terminal, y se encontró por primera vez en la hemolisina de *Escherichia coli* (Mackman et al., 1986). Esta región ha sido objeto de varios estudios (Gray et al., 1989; Koronakis et al., 1989a; Stanley et al., 1991; Zhang et al., 1995; Chervaux y Holland, 1996). Se han propuesto varios motivos estructurales y de secuencia como responsables de la función señal, pero aún se desconoce la naturaleza precisa de la señal de secreción (Gentshev et al., 2002). Por ejemplo, un estudio genético de Hui et al. (2000) mantiene que la secuencia de exportación de HlyA no está determinada por una secuencia específica, sino por elementos de la estructura secundaria y probablemente terciaria.

Formación de dímeros y oligómeros

Osička et al. (2004) han observado que determinadas proteínas RTX de bacterias Gram negativas patógenas poseen un nuevo tipo de actividad autocatalítica de corte y unión (*Clip and link*) dependiente de calcio. Consiste en la ruptura dependiente de calcio de un enlace aspartato-prolina y en la unión del fragmento amino terminal generado con la misma u otra proteína mediante la formación de un enlace covalente entre un aspartato

y una lisina (Figura 1.10). El resultado es la producción de dímeros y oligómeros de alto peso molecular muy estables, los cuales se han documentado en las proteínas RTX FrpC de *Neisseria meningitidis* y ApxIVA de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. En FrpC el segmento mínimo requerido para el corte dependiente de calcio es el comprendido entre los residuos 400 a 657. La búsqueda en bases de datos de secuencias parecidas a este fragmento revelaron la presencia de segmentos muy similares en varias proteínas RTX: ApxIVA de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, varias proteínas putativas de los patógenos de plantas *Xylella fastidiosa* y *Ralstonia solanacearum*, y la rizobiocina RzcA de *Rhizobium leguminosarum*. Por otra parte, se han encontrado en FrpC cinco secuencias potenciales de unión a calcio parecidas a los dominios *EF-hand*. Dos de ellas tienen una alta homología con el motivo consenso de los dominios *EF-hand*, y parece que son importantes para la activación dependiente de calcio de la actividad autocatalítica de FrpC. No obstante, el papel biológico de este mecanismo de corte y unión sigue siendo desconocido (Osička et al., 2004).

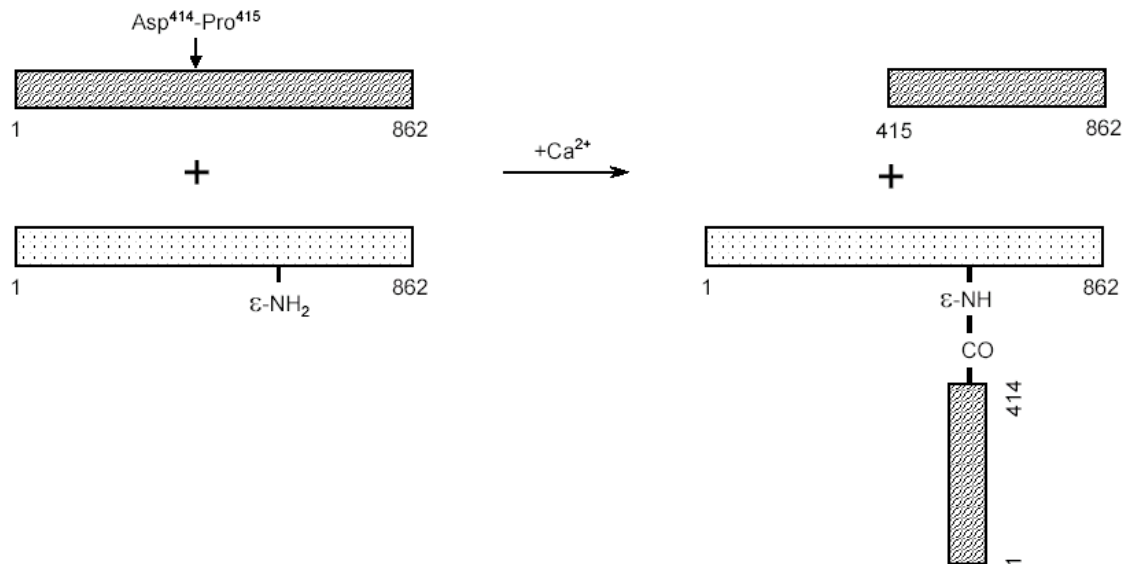


Figura 1.10: Mecanismo propuesto para la ruptura dependiente de calcio de un enlace Asp-Pro de FrpC y la formación de un enlace covalente Asp-Lys. Después de la unión a calcio se rompe el enlace Asp⁴¹⁴-Pro⁴¹⁵ y el fragmento amino terminal resultante se une a través del grupo carboxilo libre al grupo ε-amino de una Lys de otra molécula de FrpC mediante un enlace isopeptídico. Adaptada de Osička et al. (2004).

1.2.4.7. Toxinas RTX en *Rhizobium leguminosarum*

Las toxinas RTX de *Rhizobium leguminosarum* (rizobiocinas de tipo medio) están mucho menos estudiadas que otras toxinas RTX. En la Tabla 1.6 se indican varias cepas de *Rhizobium leguminosarum* productoras de rizobiocinas de tipo medio, algunas de las cuales han sido caracterizadas a nivel molecular y muestran homología con las toxinas RTX (Tabla 1.7).

Tabla 1.6: Cepas de *Rhizobium leguminosarum* productoras de bacteriocinas de tipo medio. ^a: esta cepa produce al menos dos bacteriocinas de tipo medio, siendo una de ellas similar a la bacteriocina producida por la cepa 248. ^b: la bacteriocina producida por esta cepa es de naturaleza proteica.

Cepas productoras de bacteriocinas de tipo medio pertenecientes a la familia de toxinas RTX	
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 248	Hirsch et al., 1979; Oresnik et al., 1999
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 306 ^a	Hirsch et al., 1979; Venter et al., 2001
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 162Y10	Twelker et al., 1999
Cepas productoras de bacteriocinas de tipo medio cuya estructura química está por caracterizar	
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 309 ^a	Hirsch et al., 1979
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> F15	Rodelas et al., 1998
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Z25 ^b	Rodelas et al., 1998
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> GF160	Oresnik et al., 1999
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> W14-2	Oresnik et al., 1999
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> LC-31 ^b	Hafeez et al., 2004

Tabla 1.7: Bacteriocinas secuenciadas o parcialmente secuenciadas que muestran homología con toxinas RTX. Se indica el plásmido en el que se encuentran los genes, la organización genética y el número de acceso de la secuencia. Al lado de los genes entre paréntesis se muestra el número de aminoácidos de las proteínas codificadas por estos. ^a: solo se ha encontrado el gen estructural. ^b: a continuación de *rspE* se encuentra *rspF* que tiene 388 aminoácidos y es similar a proteínas de acilación. ^c: genes parcialmente secuenciados; de *rzcA* solo se ha secuenciado la región correspondiente a los últimos 24 aminoácidos aunque debe tener más de 4000 y de *rzcD* no se ha secuenciado el extremo 3'.

Bacteriocina	Plásmido	Organización genética de la región codificante			N° de acceso
		Activador	Toxina RTX	Transportador ABC	
248	pRL1JI		<i>rzcA</i> (958) ^a		AJ001518
162Y10	pRle162Y10C	<i>rzcC</i> (190)	<i>rzcA</i> (4163)	<i>rspD</i> (571) <i>rspE</i> (436) ^b	AF141932
306c	pRle306c	Sin secuenciar	<i>rzcA</i> (>4000) ^c	<i>rzcB</i> (735) <i>rzcD</i> (393) ^c	AF273216

Oresnik et al. (1999) fueron los primeros en describir que una rizobiocina de tipo medio como es la producida por la cepa 248 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* presentaba homología con las toxinas RTX. Esta rizobiocina está codificada por el gen *rzcA*, que se encuentra en el plásmido simbiótico pRL1JI. Este gen tiene un porcentaje de G+C del 54%, lo cual es bajo en comparación con el porcentaje del 58 al 60% que se espera para las cepas de *Rhizobium* (Freiberg et al., 1997). Los estudios de expresión llevados a cabo con una fusión transcripcional del gen *rzcA* muestran que este se

expresa de manera constitutiva en medio TY, y que la actividad transcripcional no depende de la fase de crecimiento del cultivo. Los otros genes que forman parte de los operones *rtx* no han sido encontrados aún en esta cepa, aunque la secuenciación de la zona y estudios de mutagénesis con Tn5 parecen indicar que *rzcA* es el único gen necesario para la actividad de la rizobiocina.

La proteína RzcA, de 958 aminoácidos y 102,5 kDa, contiene veinte repeticiones de la secuencia consenso anteriormente citada (ver apartado 1.2.4.5) si relajamos la posición 2 y la posición 8 es L/I/F: GXXGXDX(L/I/F)X. Asimismo posee un segundo motivo de 19 a 25 aminoácidos que se repite unas seis veces a intervalos regulares de 127 a 132 aminoácidos, pero se desconoce su significado biológico (Figura 1.11). Este segundo motivo está bastante bien conservado en la proteína, y algunos aminoácidos parece que están fuertemente conservados. Es interesante que la proteína RzcA está compuesta en un 27% por los aminoácidos glicina y aspartato, tiene un punto isoeléctrico de 3,7 y posee solo tres cisteínas, las cuales se encuentran en los últimos 50 aminoácidos del extremo carboxilo terminal. Asimismo, parece que el extremo carboxilo terminal no es indispensable para la actividad pues insertos de Tn5 en esta zona no consiguen abolirla. La actividad de la rizobiocina es dependiente de calcio, y una vez unido el calcio a la bacteriocina no se puede eliminar con un tratamiento con EGTA, como ocurre con las toxinas RTX.

Se desconoce el mecanismo de secreción y transporte de RzcA, aunque parece ser que no está relacionado con las proteínas PrsD y PrsE (responsables del transporte de la proteína RTX NodO), o que utilizan más de una ruta de secreción. Al introducir un plásmido que porta el gen *rzcA* (pBAC12) en distintas cepas de *Rhizobium leguminosarum* y en *Sinorhizobium meliloti*, este confiere la producción de bacteriocina incluso en cepas sensibles sin efectos negativos. Además la mutante en *rzcA* de la cepa 248 no es sensible a la bacteriocina, lo que hace pensar que el gen de inmunidad esté en el plásmido pBAC12. Sin embargo, por la localización de las deleciones, la secuenciación parcial y los insertos de Tn5 realizados en pBAC12 no hay muchas

pruebas que demuestren la existencia de un gen de inmunidad. Se ha visto que la bacteriocina 248 tiene efecto en la competitividad por la nodulación de guisante cuando se ensaya frente a diferentes cepas.

.	*.*	***.	.
QQXXXXXXGYYGIEKIEFADGSSWXR			
DD	DFA	L R	SGNT
E	PW	F S	T

Figura 1.11: Segundo motivo repetido encontrado en la cepa 248 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Se han indicado las posiciones que tienen aminoácidos conservados con un asterisco (*) y las que tienen sustituciones conservativas con un punto (·). Se observa que la zona central es la que está más conservada. Adaptada de Oresnik et al. (1999).

La rizobiocina producida por la cepa 162Y10 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* también forma parte de la familia de toxinas RTX, si bien se trata de una proteína de mucho mayor tamaño (438 kDa) (Twelker et al., 1999). Al igual que en la rizobiocina de la cepa 248, aparece el segundo motivo repetido. En esta cepa, sí se han encontrado al lado del gen estructural *rzcA* los genes para la acilación post-traducciona (*rzcC*) y para el sistema de secreción de tipo I (*rspDE* que son similares a *hlyBD*). El orden de los genes es el común para otras toxinas RTX, y esta región se encuentra en el megaplásmido pRle162Y10C (Twelker et al., 1999). Se han realizado estudios de expresión con fusiones transcripcionales del gen *rzcA* que sugieren que en células de vida libre la producción de rizobiocina probablemente es constitutiva, al igual que en el caso de la cepa 248 (Venter et al., 2001).

La cepa 306 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* produce al menos dos bacteriocinas de tipo medio (Venter et al., 2001). Una de ellas está codificada por el plásmido pRle306b y es similar a la producida por la cepa 248. La otra está codificada por el plásmido pRle306c y ha sido parcialmente secuenciada. El análisis de la secuencia disponible determinó la presencia del extremo 3' de un ORF que mostraba similitud con varias toxinas RTX. Este ORF parcial se denominó *rzcA* y se estima que

debe tener una longitud de más de 12 kb. A continuación se encuentran los genes que codifican el sistema de transporte de tipo I (*rzcBD*), como demuestra el hecho de que una mutante en *rzcD* de la cepa 306 pierde la actividad bacteriocina. La organización genética del operón de la bacteriocina 306c es similar al de la bacteriocina de la cepa 162Y10 y al exhibido por la mayoría de las toxinas RTX. Una particularidad de la proteína RzcA de la cepa 306c es que es mucho menos estable que las bacteriocinas de las cepas 248 y 162Y10. No se tienen pruebas de que la bacteriocina 306c sea un determinante de la competitividad. Es posible que sea importante bajo condiciones que no se han examinado o bien que esta bacteriocina tenga una función alternativa como el mantenimiento de pRle306c en las poblaciones bacterianas (Venter et al., 2001).

Existen otras bacteriocinas de tipo medio producidas por *Rhizobium leguminosarum* que están parcialmente caracterizadas. La bacteriocina de la cepa Z25 es una sustancia antimicrobiana no dializable que solo es activa frente a cepas muy relacionadas principalmente las de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Esta bacteriocina se inactiva por enzimas proteolíticas y es sensible a la temperatura. Se empieza a inactivar por encima de los 50°C y es totalmente destruida después de una hora a 70°C. Todo esto sugiere que la bacteriocina es de naturaleza proteica. Asimismo es más estable a pH alcalino que a pH ácido, y la sensibilidad al calor depende fuertemente del pH. La bacteriocina se produce tanto en medio mínimo como en medio completo bajo un amplio rango de temperaturas de incubación y usando varios compuestos como únicas fuentes de carbono y nitrógeno (Rodelas et al, 1998). Por otra parte, la bacteriocina de la cepa LC-31 se ha aislado y se ha purificado parcialmente. La fracción de la bacteriocina migró como un polipéptido de 50 kDa en una electroforesis SDS-PAGE y al ensayar esta fracción frente a cepas relacionadas mostró el mismo patrón de actividad que la cepa LC-31 (Hafeez et al., 2004).

El mecanismo exacto por el que las rizobiocinas tipo RTX ejercen su efecto letal es aún desconocido, pero se piensa que debe ser parecido al de las demás toxinas RTX.

Proteínas transportadoras de proteínas RTX en la familia Rhizobiaceae

Rhizobium leguminosarum produce dos rizobiocinas bien caracterizadas, la rizobiocina 248 (Oresnik et al., 1999) y RzcA (Venter et al., 2001), y además en la base de datos NCBI se encuentran dos rizobiocinas putativas, RzcA de *Agrobacterium tumefaciens* (NP_534890) y RzcA de *Mesorhizobium loti* (NP_102710). Asimismo, varias proteínas RTX potenciales anotadas como proteínas de unión a calcio son producidas por *Sinorhizobium meliloti* (por ejemplo, NP_386140) y *Xylella fastidiosa* 9a5c (por ejemplo, AAF83821). Los genes que codifican para estas proteínas RTX están cercanos a los que codifican la proteína ABC putativa del transportador (Omori e Idei, 2003).

A continuación se pueden ver dos ejemplos de transportadores de proteínas RTX en la familia *Rhizobiaceae*:

- ExpE1, una proteína RTX de unión a calcio de *Sinorhizobium meliloti* (Becker et al., 1997), es secretada por ExpD1 (ABC) y ExpD2 (MFP), estando codificadas ambas por el mismo *cluster* de genes. La proteína ExpE1 es necesaria para la síntesis o la secreción del exopolisacárido galactoglucano (EPSII), aunque el papel exacto de esta proteína y de su sistema de transporte en la producción de EPSII es desconocido (Moreira et al., 2000).

- La proteína de estimulación de la nodulación NodO (de Maagd et al., 1989) también pertenece a la familia de proteínas RTX. El transportador de NodO lo componen PrsD (ABC) y PrsE (MFP), los cuales están codificados por el operón *prsDE* (Finnie et al., 1998), pero no se ha identificado todavía la proteína de membrana externa. El transportador Prs también es responsable de la secreción de dos glicanasas

extracelulares, PlyA y PlyB, las cuales tienen actividad degradadora de polisacáridos (Finnie et al., 1998). Es interesante el hecho de que PlyA y PlyB no contienen repeticiones nonapeptídicas, pero sí heptapéptidos N(I/V)X(I/V)X(D/E)N. Aunque la presencia de estas repeticiones RTX parece ser característica de las proteínas secretadas por los transportadores ABC, se ha demostrado que esta región no es esencial para la secreción (Omori e Idei, 2003).

1.3. TOXINAS RTX Y REGULACIÓN

La regulación de las toxinas RTX se ha estudiado en profundidad en el caso de la hemolisina de *Escherichia coli* y también en algunas leucotoxinas.

1.3.1. Hemolisina HlyA de *Escherichia coli*

La toxina HlyA es un importante factor de virulencia en las infecciones extraintestinales ocasionadas por *Escherichia coli*, tales como las del tracto urinario alto (Welch et al., 1981; Hacker et al., 1983; Felmlee et al., 1985; Hess et al., 1986).

Tal y como se indicó en la Tabla 1.5, la síntesis, maduración y secreción de HlyA está determinada por el operón *hlyCABD* (Felmlee et al., 1985; Issartel et al., 1991; Koronakis y Hughes, 1996; Nieto et al., 1996). En *E. coli* este operón se encuentra en islas de patogenicidad en el cromosoma o bien en plásmidos transmisibles, lo que sugiere que se puede transmitir por transferencia genética horizontal entre bacterias Gram-negativas (Knapp et al., 1986; Ludwig y Goebel, 1999).

El operón *hly* se transcribe a partir de un promotor situado en posición 5' con respecto al gen *hlyC* (Welch y Pellett, 1988), y existen varios mecanismos relacionados con su regulación. Las principales secuencias reguladoras se encuentran en posición 5' con respecto a la zona promotora; una de ellas es la secuencia de 650 pb *hlyR* (Vogel et al., 1988), la cual está a 1,5 kb del gen *hlyC* en dirección 5'. Se trata de una secuencia reguladora de tipo activador en *cis* que está separada del operón por una secuencia de inserción denominada IS2. Dentro de la secuencia *hlyR* se puede encontrar el elemento *ops* (*operon polarity suppressor*), elemento antiterminador que aparece frecuentemente en operones bacterianos largos tales como los relacionados con la síntesis de lipopolisacáridos y de la cápsula o con la conjugación (ver apartado 1.3.1.1) (Nieto et

al., 1996). Tanto la orientación de *hlyR* como la distancia de esta secuencia al promotor es crucial para activar la expresión del operón *hly* (Hahn y von Specht, 2003). La delección de *hlyR* da lugar a una represión no natural de la expresión de la hemolisina (Vogel et al., 1988; Carmona et al., 1993). Este fenotipo se podría atribuir a la pérdida del elemento *ops*, pero aún no se ha demostrado. Por otra parte, además de este mecanismo de antiterminación se sabe que el operón *hly* está regulado por la temperatura y la osmolaridad (Mouriño et al., 1994, 1996). De hecho, está bien establecido que la expresión de muchos factores de virulencia se encuentra regulada por parámetros medioambientales, como la temperatura, la osmolaridad, el pH, y la disponibilidad de oxígeno (Mekalanos, 1992; Gardel y Mekalanos, 1994; Falconi et al., 1998). Gracias a los estudios basados en la regulación del operón *hly* (plásmido pHly152) se identificó la proteína Hha (Nieto et al., 1991; Carmona et al., 1993), y se observó que en las mutantes *hha* la expresión de la hemolisina pasa a estar parcialmente reprimida en condiciones de temperatura y osmolaridad en las que debía estar totalmente reprimida. Asimismo, se ha encontrado que Hha interacciona con una proteína asociada a nucleóide denominada H-NS (Nieto et al., 2000).

1.3.1.1. Regulación de *hly* por RfaH y *ops*

Las proteínas de transporte (HlyB y HlyD) se sintetizan en menor cantidad que las proteínas citosólicas HlyC y pro-HlyA como consecuencia de un terminador de la transcripción independiente de *rho* situado en la zona intergénica *hlyA-hlyB* (Felmlee et al., 1985, Welch y Pellett, 1988). Esta terminación de la transcripción se suprime gracias a la proteína de elongación **RfaH** y a una secuencia de ADN en 5' que actúa en *cis* denominada elemento ***ops*** (*operon polarity suppressor*) (Vogel et al., 1988; Cross et al., 1990; Bailey et al., 1992, 1996; Nieto et al., 1996). Ambos elementos deben actuar juntos para conseguir la transcripción eficiente de operones largos como *hly*, *rfa* y *tra*, que son responsables de la síntesis y el transporte de componentes extracelulares

importantes para la virulencia y la fertilidad de bacterias Gram-negativas (Bailey et al., 1992, 1997).

Al mutar el gen *rfaH* se observó una disminución modesta de la transcripción de *hlyCA* y casi una completa abolición de la transcripción de los genes distales *hlyBD* (Bailey et al., 1992; Nieto et al., 1996; Leeds y Welch, 1996, 1997). Se compararon las secuencias de los operones *hly*, *rfa* y *tra* (dependientes de RfaH) para ver si compartían motivos que pudieran ser relacionados con la función de RfaH, y se encontró uno de 8 pares de bases 5'-GGCGGTAG-3' en las secuencias no codificantes en 5' y dentro de los operones (Bailey et al., 1992). La delección en el plásmido pHly152 de esta secuencia situada a 2 kb en dirección 5' con respecto al operón *hly* redujo la expresión de los genes próximos al promotor y abolió la expresión de los genes distales, es decir, aumentó la polaridad transcripcional dentro del operón. Por esta razón este motivo se denominó elemento *ops* (*operon polarity supressor*). La delección del elemento *ops* situado por delante del operón *hly* da el mismo fenotipo transcripcional que las mutaciones *rfaH* (Bailey et al., 1996; Nieto et al., 1996). El elemento *ops* funciona incluso con operones no nativos y puede aumentar la transcripción de genes distales situados hasta a 10 kb (Nieto et al., 1996). El elemento *ops* puede llegar a estar dentro del operón a 5 kb en dirección 3' con respecto al promotor, como es el caso del operón *tra* en el que el elemento *ops* se encuentra entre los genes *traV* y *traR*.

Al examinar los genomas procariotas disponibles se ha visto que el elemento *ops* está conservado en un amplio rango de bacterias patógenas Gram-negativas, tales como *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae* (Nieto et al., 1996). La comparación de ejemplos conocidos de elementos *ops* en *E. coli* muestra que el motivo de 8 pb y un residuo de timina situado a 3 bases en dirección 3' están totalmente conservados. La secuencia situada en 5' con respecto al motivo de 8 pb tiene varios grados de

conservación (Bailey et al., 1997). En la región 5' de varios operones de *E. coli* (*rfa*, *rfb*, *cps*, *kps*) se ha encontrado un motivo conservado de 39 pb 5'-GGTAGC-N(15)-GGTAGC-3' en el que el elemento *ops* es la segunda mitad de la repetición directa. Este motivo se denomina secuencia JUMPstart (Hobbs y Reeves, 1994) debido a que en un principio se identificó en la región 5' de operones relacionados con la biosíntesis de polisacáridos (*just upstream of many polysaccharide-associated gene starts*). Sin embargo, existen muchos ejemplos de operones no relacionados con los polisacáridos (Nieto et al., 1996). Al comparar todas las secuencias JUMPstart conocidas se ha observado que la parte más conservada es la región 3' correspondiente al elemento *ops*. Se ha sugerido que el elemento *ops* disminuye la concentración de RfaH necesaria para abolir la polaridad transcripcional dentro del transcrito en el que se encuentra dicho elemento. Esto es consistente con la idea de que este elemento recluta a la proteína RfaH al complejo de transcripción (Bailey et al., 1997). Se ha descartado la posibilidad de que la proteína RfaH aumente la transcripción desde algún promotor en posición 5' o dentro del operón (Bailey et al., 1996; Leeds y Welch, 1996; Stevens et al., 1997), y se ha llegado al consenso de que el complejo de elongación RNAP (ARN polimerasa) influenciado por RfaH resiste las señales de terminación de la transcripción que se encuentren en posición 3' con respecto al elemento *ops* (Bailey et al., 1997).

1.3.1.2. Regulación de *hly* por H-NS y Hha

Proteína H-NS

Las proteínas asociadas a nucleóide son reguladores genéticos de carácter global. Forman un grupo heterogéneo de polipéptidos (Azam e Ishihama, 1999; Azam et al., 1999), que se catalogan como familia basándose en características de naturaleza muy general. Se unen a ácidos nucleicos (normalmente ADN), son de carácter básico y tienen bajos pesos moleculares. A veces se hace referencia a ellas como proteínas de

tipo histona, aunque la similitud con las histonas eucarióticas es sólo funcional ya que sus secuencias de aminoácidos no se parecen. En *Escherichia coli* se han descrito al menos 12 proteínas asociadas a nucleóide (Azam e Ishihama, 1999), cada una de ellas con su propio patrón de expresión y sus preferencias de unión a ADN. Las proteínas más estudiadas son H-NS (*heat-stable nucleoid-structuring*), StpA (paróloga de H-NS), Fis (*factor for inversion stimulation*), HU (*heat-unstable*) y su pariente cercano IHF (*integration host factor*) (Dorman, 2004).

La proteína H-NS es una proteína abundante de aproximadamente 15 kDa (Dorman et al., 1999; Schröder y Wagner, 2002; Tendeng y Bertin, 2003) y 137 aminoácidos. Se expresa de manera relativamente constante en todas las fases del crecimiento, aunque algunos autores hablan de un pequeño aumento en la fase estacionaria temprana (Hinton et al., 1992; Dersch et al., 1993; Ueguchi et al., 1993; Free y Dorman, 1995; Falconi et al., 1996). Las proteínas H-NS y StpA autorregulan negativamente la transcripción de sus propios genes, y además cada una reprime el gen que codifica la otra proteína en *trans* (Dersch et al., 1993; Falconi et al., 1993; Ueguchi et al., 1993; Sonden y Uhlin, 1996; Zhang et al., 1996a; Free y Dorman, 1997; Deighan et al., 2003). La regulación del promotor del gen *hns* es compleja y una revisión del tema está disponible en Dorman (2004).

La proteína H-NS juega un papel esencial como modulador de la expresión de genes en respuesta a los cambios de osmolaridad y temperatura (revisado por Ussery et al., 1994; Atlung e Ingmer, 1997; Williams y Rimsky, 1997; Dorman, 2004). De hecho, H-NS afecta a la expresión de un gran número de genes (Atlung e Ingmer, 1997; Laurent-Winter et al., 1997; Hommais et al., 2001) y está considerado como un regulador transcripcional negativo general. La aparente promiscuidad de H-NS deriva de la falta de una secuencia consenso para unirse a ADN, en su lugar tiene una estructura consenso. Esta estructura es ADN curvado (Yamada et al., 1990, 1991), la

cual está normalmente asociada con los promotores (Bracco et al., 1989; Jáuregui et al., 2003). Además de unirse preferentemente al ADN curvado (Yamada et al., 1991), H-NS es capaz de crear curvatura en ADN no curvado (Spurio et al., 1997). Por otra parte, la influencia negativa de H-NS no está limitada a la transcripción, sino que también puede inhibir la recombinación (Kawula y Orndorff, 1991; O’Gara y Dorman, 2000). Asimismo, H-NS puede unirse a ARN y se sabe que puede actuar a nivel post-transcripcional (Brescia et al., 2004).

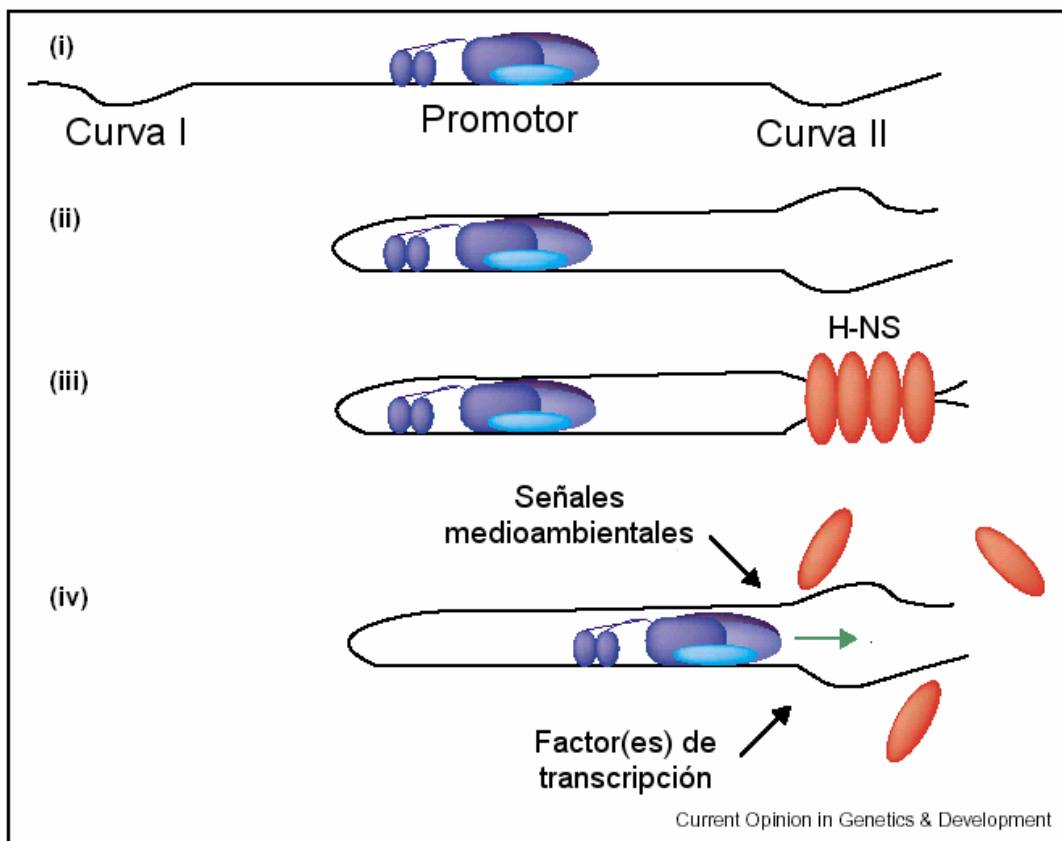


Figura 1.12: Mecanismo de acción de H-NS. Adaptada de Dorman y Deighan (2003).

El mecanismo por el que la proteína H-NS reprime la transcripción se ha estudiado con detalle en unos pocos casos y se han encontrado algunas características comunes: a) la proteína es atraída a una región de ADN curvado de manera intrínseca que está situada en la zona promotora que se va a reprimir; b) existe más de un sitio de unión para H-NS; c) la represión conlleva la formación de un bucle que está cerrado por lo menos por dos moléculas de H-NS unidas a ADN; d) la ARN polimerasa queda atrapada dentro del bucle anteriormente mencionado (Dorman y Deighan, 2003) evitando así la elongación de la transcripción (Figura 1.12). Este mecanismo se ha demostrado para el promotor P1 del gen ribosomal *rrnB* de *E. coli* que codifica ARN ribosómico (Schröder y Wagner, 2000; Dame et al., 2001, 2002) y se ha propuesto para el promotor *proU* (Schröder y Wagner, 2002). Es posible que el gen regulador de la virulencia *virF* de *Shigella flexneri* tenga un mecanismo de regulación similar (Falconi et al., 2001).

En el caso del operón *bgl* (β -glucósido) la regulación por HNS se debe a dos mecanismos independientes (Figura 1.13). En primer lugar, la unión de HNS a una región rica en AT y presumiblemente curvada localizada en posición 5' con respecto al promotor hace que se reprima el inicio de la transcripción. En segundo lugar, HNS también se une a una región situada dentro de la zona codificante del primer gen del operón (*bglG*) a 600-700 pb en dirección 3' con respecto al promotor, la cual se predice que es curvada (Munteanu et al., 1998). Esta unión es responsable de un fenómeno conocido como polaridad de la transcripción dependiente del factor de terminación Rho. En general, la polaridad es el resultado de una pausa en la elongación de la transcripción que permite al factor Rho alcanzar la ARN polimerasa y terminar la elongación de la transcripción. En este caso la pausa se debe a que HNS se une a la región en 3' y actúa como un retén para la ARN polimerasa. Además, los dos efectos represores anteriores se podrían aumentar al unir la proteína HNS los dos sitios de unión a HNS para formar

un retén que bloquea de manera muy efectiva la elongación de la transcripción (Dole et al., 2004; Rimsky, 2004).

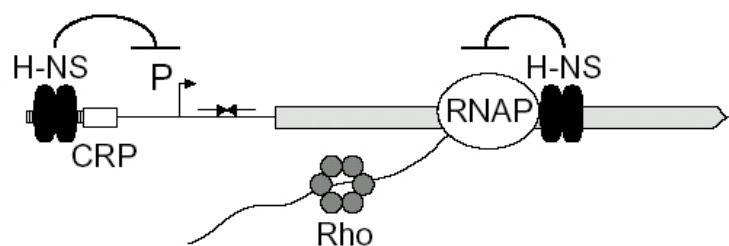


Figura 1.13: Modelo de la represión del operón *bgl* por H-NS a dos niveles. Adaptada de Dole et al. (2004).

La capacidad de H-NS de generar estas estructuras ADN-proteína de carácter represor se debe a la estructura de la proteína (Figura 1.14). El dímero es la unidad funcional básica, y como resultado de la oligomerización de éstos se consiguen estructuras de mayor orden (Badaut et al., 2002). El alineamiento de los dímeros da lugar a la creación de estructuras oligoméricas que actúan como una cremallera que acerca los fragmentos de ADN a los que se une H-NS (Figura 1.12). El dominio amino terminal es responsable de la oligomerización de la proteína y el dominio carboxilo terminal se caracteriza por poderse unir a ácidos nucleicos. Ambos dominios funcionales están unidos por una región conectora (Dorman et al., 1999). Se ha sugerido que los oligómeros de mayor orden se forman gracias a la región central de la proteína, incluyendo la región conectora (Bloch et al., 2003). El dominio de dimerización está muy conservado entre los miembros de la familia H-NS, y parece probable que de esta manera se faciliten las interacciones heteroméricas. Además la unión a ADN también depende del dominio amino terminal, es decir, de la formación de dímeros (Dorman, 2004). En la región carboxilo terminal existe un motivo de unión a ADN

TWTGXGRXP, que está muy conservado en la familia de proteínas H-NS (Dorman et al., 1999). La fluorescencia del triptófano (W) del motivo anterior aumenta cuando la proteína interacciona con ADN curvado (Tippner y Wagner, 1995) y la prolina (P) es responsable de la capacidad de distinguir entre ADN curvado y no curvado (Spurio et al., 1997).

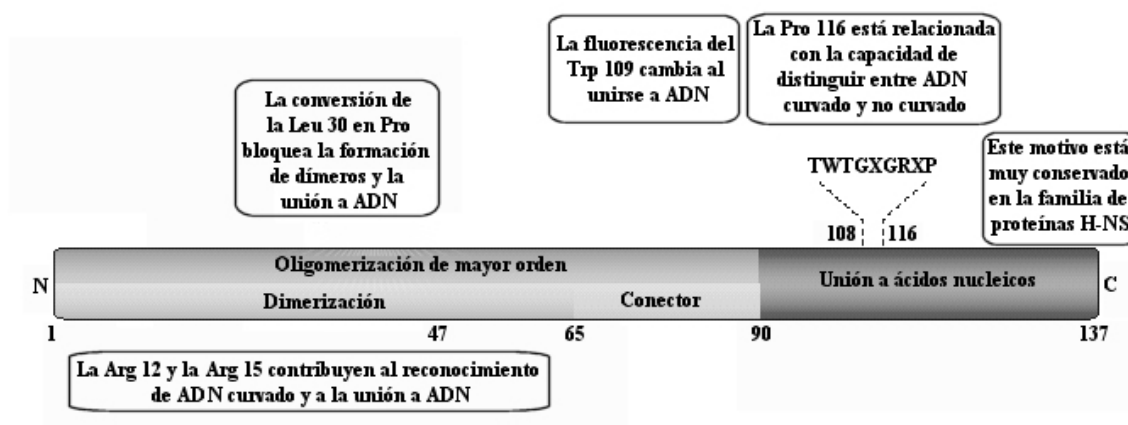


Figura 1.14: Estructura de la proteína H-NS de *Escherichia coli*. Se han indicado las principales características de la estructura de H-NS. El dominio de dimerización está formado por tres hélices α (residuos 1-8, 12-19 y 23-47). Adaptada de Dorman (2004).

Estas estructuras se pueden interrumpir por otras proteínas tipo histona como HU y por factores de transcripción convencionales (por ejemplo, proteínas específicas de determinados operones o regulones). Es interesante el hecho de que muchos genes reprimidos por H-NS requieren activadores transcripcionales (en realidad, anti-represores) para vencer la represión (Schröder y Wagner, 2002; Yu y DiRita, 2002). En algunos casos son las señales medioambientales las que contribuyen a la interrupción de los complejos de represión. Especialmente importantes son la temperatura y la osmolaridad, dos condiciones que alteran la topología del ADN en la bacteria (Dorman, 2002). Además son dos señales claves que experimentan las bacterias patógenas durante

la infección, y es interesante recordar que muchos genes de virulencia que se encuentran bajo el control de H-NS también responden a dichas señales. Un aumento de temperatura o la adición de NaCl o KCl inhibe la interacción de H-NS con el ADN del bacteriófago λ (Amit et al., 2003), y un aumento de temperatura inhibe la interacción *in vitro* entre H-NS y la secuencia curvada del promotor de *proU* (Badaut et al., 2002). En *Shigella flexneri*, el principal regulador de la expresión de genes de invasión (*virB*) está reprimido por H-NS y es activado por VirF, un factor de la transcripción tipo AraC, en colaboración con un cambio en el superenrollamiento del ADN (Dorman et al., 2001). Dorman y Deighan (2003) han anticipado que la interrupción del complejo de represión H-NS por un superenrollamiento local del ADN en combinación con un factor proteico positivo podría ser un mecanismo regulador común en los promotores reprimidos por proteínas de tipo histona.

Por otra parte, la proteína H-NS puede encontrarse acompañada en la célula por una proteína paróloga codificada por un gen cuyo patrón de expresión es diferente del de *hns* (Dorman et al., 1999). Parálogos son secuencias o genes que proceden de una secuencia o gen ancestral común por un fenómeno de duplicación. En varias bacterias Gram-negativas esta proteína es StpA, la cual posee una homología de secuencia del 58% con la proteína H-NS y puede formar heterodímeros con ella. StpA tiene un peso molecular parecido al de H-NS, pero se encuentra en menor cantidad en la célula. El papel de StpA *in vivo* aún no se conoce (Deighan et al., 2000; Free et al., 2001), pero parece abarcar al menos un papel como ARN chaperona (Waldsich et al., 2002). Por otra parte, existen otras proteínas parálogas en las bacterias Gram-negativas, como la proteína Sfh (*Shigella flexneri* H-NS-like protein) de *Shigella flexneri* serotipo 2a cepa 2457T que puede interactuar con H-NS y con StpA (Dorman y Deighan, 2003). Otros ejemplos de proteínas que interaccionan con H-NS son FliG [proteína motora flagelar (Donato y Kawula, 1998)], Hfq o HF-1 [modula la traducción del ARN mensajero de

rpoS (Muffler et al., 1996; Nogueira y Springer, 2000)], y Hha de la que se habla a continuación.

Proteína Hha

La proteína Hha pertenece a una nueva familia de moduladores que incluye, entre otras, a la proteína YmoA. Hha es un polipéptido de unión a ADN de 8,5 kDa asociado a nucleóide (Nieto et al., 1991, 2000, 2002). Se identificó como un regulador dependiente de la temperatura y de la osmolaridad de la expresión de la α -hemolisina en *E. coli*, y se ha visto que forma un complejo con la proteína H-NS (Nieto et al., 2002). YmoA es un modulador dependiente de la temperatura de la expresión de diferentes factores de virulencia (proteínas Yop y adhesina YadA) en *Yersinia enterocolitica* (Cornelis et al., 1991). Ambas proteínas tienen un alto grado de conservación, con el 82% de sus aminoácidos idénticos, y además son funcionalmente intercambiables (de la Cruz et al., 1992; Mikulskis y Cornelis, 1994; Balsalobre et al., 1996). Otros ejemplos de miembros de esta familia se pueden encontrar en la Tabla 1.8.

Tabla 1.8: Familia de proteínas Hha/YmoA (Madrid et al., 2002b).

Proteína	Bacteria	Función	Referencia
Hha	<i>Escherichia coli</i>	Modula la expresión de la α -hemolisina	Nieto et al., 1991
Hha	<i>E. coli</i> O157:H7 plásmido pO157	Proteína hipotética con homología con la familia de proteínas Hha/YmoA	Burland et al., 1998
Hha	<i>Salmonella typhimurium</i>	Reprime el fenotipo invasivo mediante la modulación de la expresión de <i>hlyA</i>	Fahlen et al., 2000
Hha	<i>Salmonella typhi</i> plásmido R27	Regulador putativo de la transferencia del plásmido R27 (grupo de incompatibilidad IncH) en función de la temperatura	Sherburne et al., 2000
Hmo	<i>Shigella flexneri</i> plásmido pWR501	Regulador putativo	Venkatesan et al., 2001
Orf5	<i>Proteus morgani</i> plásmido R446	Modula la expresión de los <i>pili</i> conjugativos en función de la temperatura (homólogo a RmoA)	Tietze y Tschäpe, 1994; Nieto y Juárez, 1996
RmoA	<i>Escherichia coli</i> plásmido R100	Modula la transferencia de plásmidos (frecuencia de conjugación de R100) en respuesta a factores medioambientales como la osmolaridad	Nieto et al., 1998
YdgT	<i>E. coli</i> K-12	Proteína hipotética con homología con la familia de proteínas Hha/YmoA	Madrid et al., 2002b
YmoA	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Modula la expresión de varios factores de virulencia en función de la temperatura	Cornelis et al., 1991

Papel de Hha y H-NS en la regulación del operón hly

El fenotipo de las mutantes dobles *hha/hns*, que han perdido la regulación por temperatura y osmolaridad de la expresión de la hemolisina (Nieto et al., 2000), demuestra que el complejo Hha-H-NS tiene un papel claro en la regulación termo-osmótica del operón *hly* (Madrid et al., 2002a). El papel de Hha en la modulación de la expresión de *hly* parece ser la formación de un complejo hetero-oligomérico con H-NS que reprime la transcripción de *hly* de manera más eficiente que los oligómeros de H-NS solos (Madrid et al., 2002a). De hecho, el complejo Hha-H-NS-ADN migra más lentamente que los obtenidos con Hha o con H-NS, lo que sugiere que en el complejo

Hha-H-NS-ADN existe una interacción directa entre ambas proteínas (Madrid et al., 2002b). Mediante estudios de mutagénesis se ha observado que la proteína Hha está implicada en su totalidad en la interacción con H-NS. Los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de H-NS y Hha han mostrado que estas proteínas comparten una homología significativa en sus regiones amino terminal, que corresponden al dominio de oligomerización de H-NS (Nieto et al., 2002; Dorman 2004). Por lo tanto parece claro que Hha funciona alterando la actividad de H-NS mediante la formación de un complejo para regular un conjunto específico de genes, de los cuales el gen de la α -hemolisina es el mejor caracterizado (Dorman, 2004).

Nieto et al. (2000) encontraron que la proteína Hha se une a la región reguladora de *hly* con una relación proteína/ADN mayor que en el caso de H-NS. Para encontrar los sitios de unión específica para Hha y H-NS, Madrid et al. (2002a) llevaron a cabo ensayos de competición en geles de retardo en los que emplearon una mezcla de fragmentos de ADN de la zona reguladora del operón *hly* (fragmento *SalI-BamHI* de unas 4,9 kb en dirección 5' con respecto a un sitio de restricción *BamHI* localizado en el gen *hlyC*) y concentraciones crecientes de Hha o H-NS (Figura 1.15). Observaron que Hha no muestra preferencia por ninguno de los fragmentos usados en el experimento. Sin embargo, H-NS se une a dos de los cinco fragmentos empleados (1,7 y 1,1 kb) de manera preferente. Asimismo se han identificado dos sitios de unión a H-NS (sitios I y II): el primero está dentro de la secuencia *hlyR* (nucleótidos 190 a 350) y el segundo se encuentra solapando parcialmente la región promotora del operón *hly* del plásmido pHly152. La importancia del sitio I se ha demostrado gracias a deleciones de la zona. Además se ha visto que entre los dos sitios H-NS existe una curvatura intrínseca del ADN. Esto se ha observado también en las regiones en 5' de genes reprimidos por H-NS de manera independiente de la temperatura (*hns* y *cspA*) o dependiente de la temperatura (*virF*) (Falconi et al., 1993; Falconi et al., 1998; Brandi et al., 1999). Una diferencia significativa entre el gen *virF* (Falconi et al., 1998) y el operón *hly* es la

presencia en este último de la secuencia de inserción IS2 entre los dos sitios H-NS, lo que provoca una mayor separación entre ellos. Sin embargo, el papel del elemento IS2 no se pudo clarificar al quitarlo de su sitio de inserción. Es probable que el efecto moderado de la delección de IS2 en la transcripción de *hly* se deba a que la separación entre los dos sitios H-NS de lugar a cambios topológicos en la región.

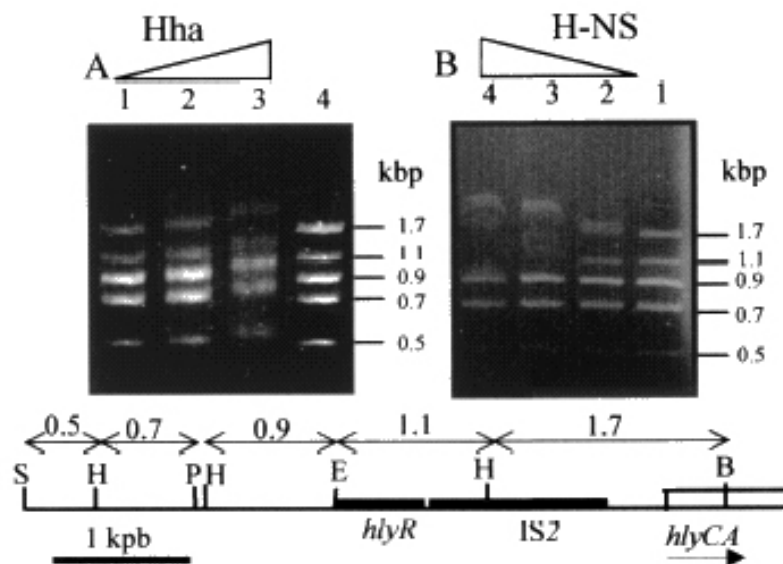


Figura 1.15: Efecto de las concentraciones crecientes de las proteínas Hha (A) y H-NS (B) en la movilidad electroforética de los fragmentos de ADN de la zona reguladora del operón *hly*. Estos fragmentos y sus tamaños aparecen representados en la parte inferior de la ilustración, junto con las secuencias *hlyR* e IS2, los genes *hlyC* y *hlyA*, y los sitios de restricción *SalI* (S), *PstI* (P), *HindIII* (H), *EcoRI* (E) y *BamHI* (B). Las calles 1, 2, 3 y 4 de A contienen 19,12, 38,24, 76,48 y 0 μM de proteína Hha respectivamente, y las calles 1, 2, 3 y 4 de B contienen 0, 0,24, 0,48 y 0,97 μM de H-NS. Madrid et al. (2002a).

Por otra parte, parece estar claro que la temperatura influye en la afinidad de H-NS por sus secuencias de unión dentro de la región reguladora del operón *hly*. De hecho, la mayor afinidad de H-NS por la zona reguladora a baja temperatura concuerda con la represión transcripcional más eficiente por H-NS a baja temperatura y con el fenotipo hemolítico de las mutantes *hns*.

1.3.2. Leucotoxina LktA de *Mannheimia haemolytica*

Mannheimia haemolytica es una bacteria patógena del aparato respiratorio del ganado bovino. Un estudio epidemiológico de cepas de *M. haemolytica* ha demostrado la correlación existente entre la producción de la leucotoxina en la fase logarítmica de crecimiento y la enfermedad pulmonar. Esta toxina presenta una amplia variedad de efectos biológicos en los leucocitos bovinos periféricos, y se puede encontrar en forma de monómero (con un peso molecular aproximado de 104 kDa) o de polímero (Narayanan et al., 2002).

La organización genética del operón *lkt* de *M. haemolytica* (*lktCABD*) es similar a la del operón de la hemolisina de *E. coli*. El ARN mensajero más abundante es un transcrito de 3,5 kb que contiene los genes *lktC* y *lktA*, y la transcripción puede acabar en un terminador putativo independiente de ρ situado en la zona intergénica *lktA-B* (Highlander et al., 1990). Asimismo, se han observado en menor cantidad transcritos que abarcan los cuatro genes del *cluster*. El inicio de transcripción de *lktCA* se encuentra a 30 nucleótidos del codón de inicio de *lktC*, y está precedido por una secuencia consenso -10 de *E. coli* (Highlander et al., 1990). Se trata de una secuencia -10 extendida, TGNTATAAT, que se encuentra en promotores de *Escherichia coli* que carecen de una secuencia consenso -35 y que requieren activadores para el inicio de la transcripción (Kumar et al., 1993). También se ha descrito un segundo inicio de transcripción en la posición -290 (Strathdee y Lo, 1989). A pesar de que se ha visto que para la secreción extracelular de la hemolisina de *E. coli* (HlyA) resulta ser esencial el producto de *tolC* (no perteneciente al operón *hly*), no se ha encontrado una proteína similar a TolC en *M. haemolytica* (Narayanan et al., 2002).

En la zona que precede al promotor de *lktC*, Highlander y Weinstock (1994) encontraron una región que se caracteriza por dar lugar a una curvatura estática debido a la presencia de cuatro repeticiones CA₆(C/T)A separadas por intervalos de aproximadamente diez nucleótidos (Figura 1.16). La delección de esta zona hizo que se redujera dos veces la transcripción de la leucotoxina en *E. coli*, lo que sugiere que esta curvatura está relacionada con la activación del promotor *lkt*. En posición 5' con respecto a los trectos de adenina existen tres repeticiones directas, A1, A2 y A3, de la secuencia TGT-N₍₁₁₋₁₂₎-ACA. Las repeticiones A2 y A3 funcionan como sitios de unión para una proteína específica de *M. haemolytica* (Highlander y Weinstock, 1994), que parece estar relacionada con la regulación positiva del operón *lkt* (Marciel y Highlander, 2001).

Entre los nucleótidos -15 y -33 existe un sitio de unión parecido al consenso para la proteína represora dependiente de hierro Fur (Marciel y Highlander, 2001). De hecho, Marciel y Highlander (2001) han observado que una disminución en la concentración de hierro ocasiona un aumento de la transcripción del promotor *lkt*, aunque previamente Strathdee y Lo (1989) habían visto que en esas condiciones disminuían los niveles de ARNm y proteína Lkt. Con respecto al nivel de oxígeno y al pH, Marciel y Highlander (2001) no han observado que tengan efecto en la transcripción de la leucotoxina, aunque estudios previos habían sugerido que sí. Un factor que sí afecta a la transcripción del operón *lkt* es la temperatura. Los cambios de menor a mayor temperatura (de 30 a 42°C) producen un aumento de la actividad del promotor *lkt* (Strathdee y Lo, 1989; Marciel y Highlander, 2001). Mediante el empleo de fusiones del operón *lkt* plasmídicas y cromosómicas, Marciel y Highlander (2001) han comprobado que la expresión de la leucotoxina a 30°C en una cepa mutante *hns*⁻ de *Escherichia coli* es mayor que en la cepa silvestre. Por lo tanto, como en el caso de la hemolisina de *Escherichia coli*, parece que la proteína HNS reprime la transcripción de la leucotoxina a bajas temperaturas. En resumen, según Marciel y Highlander (2001) el promotor de la leucotoxina es reprimido

por las proteínas Fur y HNS, y es activado por una proteína que se une a las repeticiones A2 y A3.

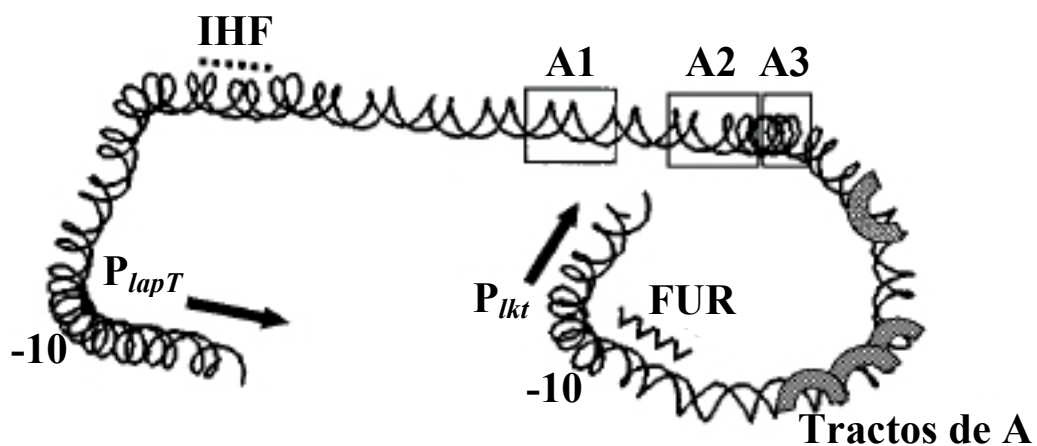


Figura 1.16: Estructura de la región promotora *lkt*. Se han representado los cuatro tractos de adenina, las repeticiones directas A1, A2 y A3, el sitio de unión a IHF parecido al consenso, el sitio potencial de unión a Fur, los promotores de *lkt* y *lapT*, y la dirección de transcripción con flechas. Adaptada de Marciel y Highlander (2001).

También se ha sugerido que existe un activador putativo de la transcripción de la leucotoxina. Esta proteína, con estructura de cremallera de leucinas, se denomina AlxA y procede de la modificación post-traducciona de un precursor que comparte con la proteína HsdM (subunidad metilasa del sistema de restricción y modificación de tipo I de *M. haemolytica*). Si se proporciona el activador en *trans*, la transcripción del gen β -galactosidasa de una fusión transcripcional (con el promotor del operón *lkt*) aumenta de 4 a 5 veces. La proteína activadora comienza con el pentapéptido TAQHS, el cual se repite 13 veces en el extremo amino terminal. Se ha demostrado que AlxA interacciona

con el promotor de la leucotoxina pero no se ha determinado si lo hace sola o en combinación con otros factores de transcripción (Highlander y Hang, 1997).

Asimismo, a partir de una librería de cósmidos se encontró un clon que inhibía la expresión de la leucotoxina en *trans* (Highlander et al., 1993). La actividad inhibidora se debe a un marco abierto de lectura (*lapA*) de 440 aminoácidos que forma parte de un *locus* de transporte de arginina formado por cuatro genes. El gen *lapA* parece que codifica para un componente de unión a nucleótidos del anterior sistema de transporte y comparte homología con la familia de proteasas Clp.

1.3.3. Leucotoxina LtxA de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Actinobacillus actinomycetemcomitans es una bacteria Gram-negativa, anaerobia facultativa que está implicada en muchas enfermedades humanas como son endocarditis, meningitis, osteomielitis y principalmente periodontitis (Slots et al., 1980; Zambon, 1985). Entre los factores de virulencia de esta bacteria se encuentra la leucotoxina LtxA, que es activa frente a linfocitos y granulocitos de humanos y grandes primates (Lally et al., 1999).

El operón de la leucotoxina está formado por cuatro genes, denominados *ltxC*, *ltxA*, *ltxB* y *ltxD*, de los cuales *ltxA* codifica para la toxina LtxA (Lally et al., 1989; Kraig et al., 1990). El gen *ltxC* es análogo al gen *hlyC* de *Escherichia coli*, que está relacionado con la acilación de la hemolisina (Issartel et al., 1991), por lo que es probable que *ltxC* tenga una función similar aunque no se haya demostrado. Los genes *ltxBD* son homólogos a los genes *hlyBD* de *E. coli* y son necesarios para la secreción de la leucotoxina (Lally et al., 1990). Además, en posición 5' con respecto al operón *ltx* existe un marco abierto de lectura (*orfA*) que codifica para una proteína putativa de

función desconocida y que se cotranscribe con el operón *ltx* (Mitchell et al., 2003). En posición 5' con respecto a *orfA* se encuentra el gen *glyA* (serina hidroximetiltransferasa) que no forma parte de la unidad transcripcional de la leucotoxina. A partir del operón de la leucotoxina se producen dos transcritos: uno minoritario de 9,5 kb, que contiene los cuatro genes, y uno mayoritario de 4,3 kb, que contiene solo los genes *ltxCA* (Spitznagel et al., 1991).

Aunque durante la fase activa de crecimiento se producen altos niveles de LtxA, cuando las células se aproximan a la fase estacionaria o cuando la bacteria se cultiva en condiciones aeróbicas la producción de la toxina disminuye sustancialmente. Este hecho hace pensar que el operón *ltx* responde a los estímulos ambientales (Spitznagel et al., 1995). Fong et al. (2001) descubrieron que la leucotoxina se puede inducir por una molécula señal de *quorum sensing* denominada autoinductor-2 (AI-2). Esta molécula de tipo furanona se describió por primera vez en *Vibrio harveyi* y su síntesis requiere la presencia de la proteína LuxS. Como los niveles de LuxS varían durante el crecimiento, esto puede tener importancia en la variación de la expresión de la leucotoxina en función de la fase de crecimiento. Sin embargo, el mecanismo por el que LuxS regula la producción de Ltx es desconocido. Por otra parte, Kolodrubetz et al. (2003) han identificado un elemento de respuesta a oxígeno (ORE, *Oxygen Response Element*) de 35 pb en la región promotora de la leucotoxina, justo delante de la secuencia -35. Su secuencia es diferente de las secuencias consenso de los sitios de unión de las proteínas reguladoras dependientes de oxígeno conocidas (Fnr y ArcAB). Además se han mutado los genes que codifican para los homólogos de Fnr y ArcA en *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, y se ha visto que no son necesarias para la regulación de la leucotoxina por oxígeno. Estos resultados sugieren una nueva ruta de regulación genética por oxígeno. Los autores especulan que la transcripción es inhibida en las células incubadas en aerobiosis por un represor que se une al promotor *ltx* ya que tanto la delección como la mutación del ORE da lugar a mayores niveles de ARN en células

aeróbicas. Este represor debe estar inactivado o ser desplazado en condiciones anaeróbicas. Kolodrubetz et al. (2003) también observaron que la expresión de la leucotoxina no varía al cambiar el pH (6,9 a 7,9), la cantidad de hierro disponible o la temperatura (*heat shock* de 37 a 42°C).

Por otra parte, la expresión de la leucotoxina varía mucho entre las cepas de *A. actinomycetemcomitans*, aunque la mayoría expresan niveles relativamente bajos de la misma (por ejemplo la cepa 652). Sin embargo, se han identificado algunas cepas que producen altos niveles de leucotoxina (Brogan et al., 1994; Kolodrubetz et al., 1996; He et al., 1999) y en estudios recientes se sugiere que estos organismos están relacionados con enfermedades periodontales humanas (Bueno et al., 1998; Haraszthy et al., 2000; Guthmiller et al., 2001; Haubek et al., 2001). El aumento de expresión de la leucotoxina en cepas de *A. actinomycetemcomitans* está relacionado con reorganizaciones génicas específicas, tanto inserciones como deleciones, en la región 5' del operón *ltx* (Brogan et al., 1994; He et al., 1999). Por ejemplo, en la cepa JP2 una deleción de 530 pb que abarca parte del *orfA* y de la región intergénica *orfA-ltxC* hace que la expresión de la toxina aumente diez veces (Brogan et al., 1994). He et al. (1999) también observaron en la cepa IS1 que la integración de una secuencia de inserción (parecida a IS1301 de *Neisseria meningitidis*) por delante de *orfA* aumenta ocho veces la expresión de la toxina. Una revertiente espontánea de la cepa IS1 que ha perdido IS1301 muestra una actividad leucotóxica significativamente reducida (He et al., 1999).

En la cepa 652 se han identificado dos secuencias que actúan en *cis* en la región promotora de *ltx* que se encuentra en posición 5' con respecto a *orfA* (P_{orf}). Una de ellas es una repetición invertida imperfecta rica en A+T que está localizada por delante de la secuencia -35 en P_{orf} . Esta secuencia parece funcionar como un regulador positivo de la expresión de la leucotoxina y además se parece a un elemento UP (Mitchell et al., 2003). Los elementos UP son secuencias ricas en A+T que actúan en *cis* de manera

positiva, que normalmente están situadas en 5' con respecto a un elemento -35 y que estimulan la transcripción al interactuar con la subunidad β de la ARN polimerasa (Ross et al., 1993; Estrem et al., 1999; Gourse et al., 2000). La segunda región reguladora que actúa en *cis* se encuentra en 5' con respecto al elemento UP putativo en la cepa 652. Esta secuencia disminuye la expresión de la leucotoxina y en experimentos de cambio de movilidad se observa que esta región interacciona con una o varias proteínas de extractos de la cepa 652 y que los nucleótidos -87 a -111 son necesarios para esta interacción. En la cepa IS1 la secuencia de inserción *IS1301* está integrada en la primera parte de la repetición invertida imperfecta rica en adenina y timina situada en la región intergénica *glyA-orfA*, concretamente en la posición -71 (Figura 1.17). La adquisición de *IS1301* desplaza a 6 nucleótidos de la repetición invertida (-71 a -77) y a la secuencia negativa putativa (-87 a -111) aproximadamente 900 pb en dirección 5' con respecto a los elementos promotores basales de P_{orf} . Según Mitchell et al. (2003) al no haber encontrado un promotor en *IS1301* responsable del aumento de la transcripción de *ltx*, es posible que el desplazamiento del elemento negativo haga que el operón *ltx* en la cepa IS1 quede controlado fundamentalmente por el elemento positivo, provocando un aumento global de la expresión de la leucotoxina. También es posible que *IS1301* contenga regiones positivas adicionales que actúen en *cis* (Mitchell et al., 2003).

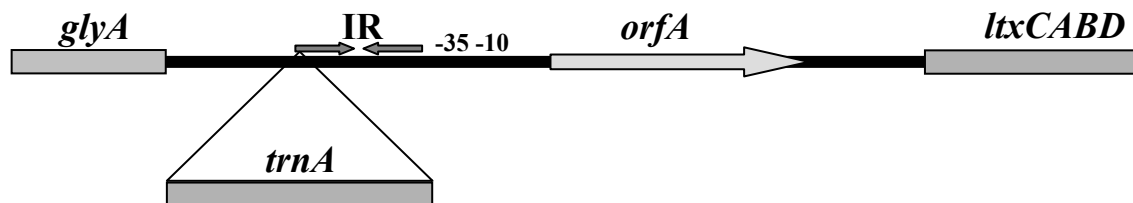


Figura 1.17: Representación esquemática del operón *ltx* y secuencias en 5' de *A. actinomycetemcomitans* cepas 652 e IS1. Se muestran el operón *ltx*, el marco abierto de lectura *orfA* (que codifica para una proteína hipotética de función desconocida y que se cotranscribe con *ltxCABD*), el gen *glyA* (que codifica para una serina hidroximetiltransferasa y que no forma parte de la unidad transcripcional de la leucotoxina), la repetición invertida imperfecta rica en AT (IR) y las secuencias -10 y -35 del promotor de *orfA* (P_{orf}). En la cepa IS1 una copia de IS1301 está integrada en la repetición invertida. IS1301 porta el gen *trnA*, que codifica para una transposasa (He et al., 1999). Adaptada de Mitchell et al. (2003).

Al realizar estudios de *primer extension* (extensión de cebador) con la cepa JP2, que se caracteriza por producir altos niveles de leucotoxina, se observó que el inicio de la transcripción ocurría en dos sitios: P1 y P2 (Brogan et al., 1994). Se llevó a cabo una serie de deleciones progresivas en el promotor de *ltx* y se llegó a la conclusión de que existe un segundo promotor justo delante de *ltxC*. Por lo tanto, a partir del operón *ltx* de la cepa JP2 se producen dos especies de ARN mensajero de 3,8 y 4,2 kb, aunque según Kolodrubetz et al. (1996) no existe el promotor P2 y el ARNm de 3,8 kb es el resultado de la degradación del ARNm de 4,2 kb. Para ver como podría estar regulada la expresión de Ltx en el microambiente periodontal se empleó una cepa de *A. actinomycetemcomitans* que contenía una fusión del promotor *ltx* de la cepa JP2 y el gen de la β -galactosidasa (sin promotor) (Spitznagel et al., 1995). En la cepa 652, que produce bajos niveles de leucotoxina, se encontró una inserción de unos 530 pb en la región que precede a *ltxC*, concretamente entre P1 y P2. Con estudios de *primer extension* y *northern blot* se determinó que en la cepa 652 el promotor P1 situado a 800 pb del codón de inicio de *ltxC* (debido a la inserción) no es funcional (Brogan et al., 1994). En un estudio posterior del mismo grupo de investigación (Hritz et al., 1996) se observó que el promotor del operón *ltxCABD* en la cepa 652 está situado en la región de

530 pb que está ausente en JP2, a 150 pb de *ltxC* (Figura 1.18). También demostraron que existe una correlación positiva entre la presencia de esta región de 530 pb y la sensibilidad a oxígeno de la transcripción de la leucotoxina; sin embargo Spitznagel et al. (1995) observaron que en la cepa JP2, que carece de la región de 530 pb, la producción de leucotoxina también está regulada por oxígeno.

Además se ha visto que en la variación de la expresión de Ltx dependiente de cepa debe existir también una proteína reguladora que actúe en *trans* (positiva o negativamente), regulando la transcripción a partir del promotor P1 (Kolodrubetz et al., 1996).

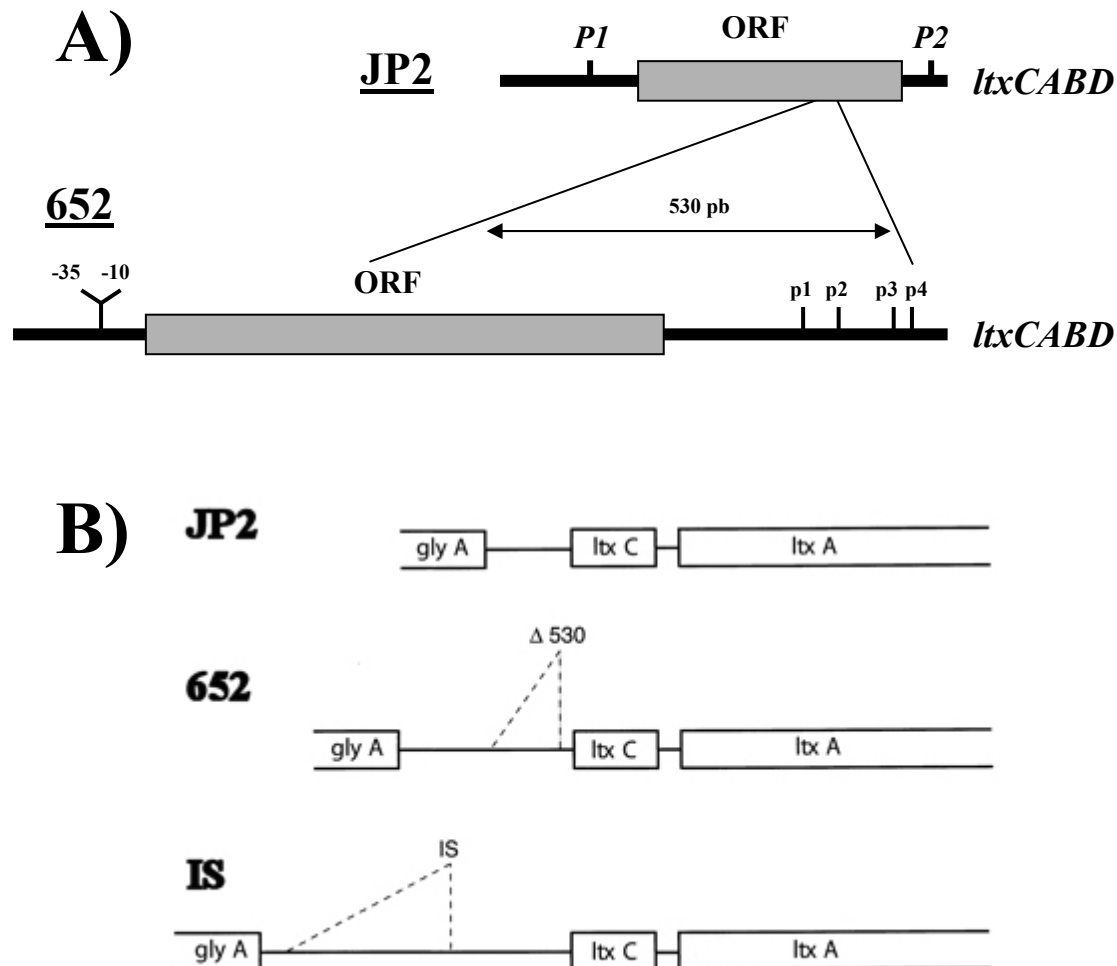


Figura 1.18: A) Estructura de los promotores *ltx* de las cepas 652 y JP2 de *A. actinomycetemcomitans*. El promotor de JP2 parece estar derivado de la región promotora de la cepa 652 por una delección de 530 pb indicada por una flecha doble. Cada secuencia contiene un marco abierto de lectura (ORF) en posición 5' con respecto a *ltxCABD*. El ORF de JP2 está truncado y su marco de lectura alterado por la delección (Brogan et al., 1994). El promotor del ORF de la cepa 652, designado -35 -10, corresponde al promotor *P1* de JP2. p1, p2, p3 y p4 son regiones de la cepa 652 similares a secuencias consenso -10 y -35 de *Escherichia coli*. *P2* corresponde al promotor de *ltx* de la cepa JP2 que está en 3' con respecto al ORF. Adaptada de Hritz et al. (1996). B) Organización genética del operón *ltx* en las cepas JP2 (con una delección de 530 pb), 652 (sin la delección de 530 pb) y en la cepa que contiene una secuencia de inserción de 886 pb. Adaptada de Poulsen et al. (2003).

1.3.4. Toxinas RTX de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Actinobacillus pleuropneumoniae es una bacteria patógena Gram-negativa responsable de las formas aguda y crónica de la pleuroneumonía porcina (Nicolet, 1992; Bosse et al., 2002). *Actinobacillus pleuropneumoniae* produce cuatro toxinas RTX (ApxI-ApxIV), y existen bastantes pruebas de que estas toxinas contribuyen a su virulencia (Frey, 1995; Bosse et al., 2002).

La organización genética de los operones ApxI (*apxICABD*) y ApxIII (*apxIIICABD*) sigue el mismo patrón general de las toxinas RTX (Welch et al., 1995). Sin embargo, el operón ApxII (*apxIICA*) no posee los genes de transporte; parece ser que aprovecharía el sistema de transporte de ApxI (Frey, 1995). Se ha determinado la organización transcripcional del operón *apxI*. La transcripción empieza a 133 pb en dirección 5' del inicio de traducción de ApxIC y produce dos transcritos; un transcrito principal de 3,5 kb correspondiente a *apxICA* y otro transcrito de 7,5 kb correspondiente a *apxICABD* (Gygi et al., 1992; Frey et al., 1994). Los estudios de la organización transcripcional de los demás operones aún no se ha completado (Jarma y Regassa, 2004).

Se conocen muy pocos detalles acerca de la expresión de los genes de las toxinas y de las señales medioambientales que pueden afectar a su expresión. La actividad transcripcional del operon *apxI* se puede aumentar diez veces al añadir calcio al medio de cultivo a concentraciones similares a las encontradas en el suero; no obstante, la expresión de *apxII* no cambia en esas condiciones de crecimiento (Gygi et al., 1992; Frey et al., 1994). El hierro reprime la producción de ApxII a concentraciones de 100 a 500 μ M (Maudsley y Kadis, 1986) y la inactivación del gen Fur hace que disminuya la

producción de ApxI (Hsu et al., 2003). Los mecanismos moleculares asociados con esas señales medioambientales no han sido elucidados.

Se ha observado que la actividad hemolítica de ApxI y ApxII aumenta al incrementarse la densidad celular (Martin et al., 1985; Maudsley y Kadis, 1986), pero no estaba claro que esto se debiera a una simple acumulación de la toxina en el medio extracelular o bien a que la expresión de los genes estuviera modulada en función de la fase de crecimiento. Jarma y Regassa (2004) han examinado la producción del ARN mensajero *apx*, encontrando un aumento del ARNm *apxICA* y *apxIICA* durante la fase exponencial tardía o la fase estacionaria temprana, lo cual indica que los genes de las dos toxinas se expresan de manera diferencial a lo largo de la curva de crecimiento. La actividad hemolítica y la cantidad de proteína extracelular acumulada aumentan al incrementarse la densidad celular. Por lo tanto, el pico post-exponencial observado en la actividad hemolítica parece ser que se debe a una regulación positiva de la expresión del gen Apx más que a una acumulación de la toxina a lo largo del tiempo. Después de llegar a un máximo en la actividad hemolítica de ApxI y ApxII, esta disminuye aproximadamente un 20-25% en una hora. Esta reducción no se debe a una rápida degradación de las proteínas Apx, sino a que las toxinas se podrían convertir en no-hemolíticas por un cambio conformacional debido al medio ambiente acuoso o por aglomeración (Welch, 2001).

Otras dos toxinas RTX están reguladas en función de la fase de crecimiento. La expresión de los genes de la α -hemolisina de *E. coli* y de la leucotoxina de *M. haemolytica* presenta un máximo durante la fase logarítmica temprana y disminuye al acercarse las células a la fase estacionaria. Es interesante que el pico de expresión de Apx aparezca a alta densidad celular cuando disminuye la tasa de crecimiento, mientras que el pico de expresión de Hly y Lkt aparece más temprano en la curva de crecimiento (Koronakis et al., 1989b; Strathdee y Lo, 1989). El transcrito *hlyCA* de *E. coli* se

expresa de manera constitutiva durante todas las fases de crecimiento (Koronakis et al., 1989b). Sin embargo, la formación del transcrito *hlyCABD* depende de un elemento en *cis* (*hlyR*) que evita la terminación transcripcional entre *hlyA* y *hlyB* (Koronakis et al., 1988; Vogel et al., 1988; Koronakis et al., 1989b). El nivel de antiterminación es mayor durante la fase logarítmica temprana y disminuye al aproximarse a la fase estacionaria (Koronakis et al., 1989b). Los autores sugieren que esta falta de antiterminación evita la producción de las proteínas de transporte (HlyB y HlyD) y por lo tanto el transporte de la α -hemolisina. En el caso de *M. haemolytica* la cantidad de ARNm *lktCA* y *lktCABD* presenta un pico durante la fase exponencial temprana y después disminuye al acercarse las células a la fase estacionaria (Strathdee y Lo, 1989). Marciel y Highlander observaron que el promotor *lkt* se expresa constitutivamente en todas las fases de crecimiento (Marciel y Highlander, 2001), lo que sugiere que la regulación de esta toxina en función de la fase de crecimiento podría ser a nivel de la elongación o de la estabilidad del ARNm. En el caso de Apx, tanto el transcrito *apxICA* como *apxIICA* presentan niveles máximos cuando las células pasan de la fase logarítmica tardía a la fase estacionaria temprana (Jarma y Regassa, 2004); esta regulación puede deberse a la actividad del promotor, a la estabilidad del ARNm y/o a la elongación del transcrito.

Se desconoce cual es la señal que estimula la expresión de *apx* durante la fase exponencial tardía o la fase estacionaria temprana, aunque hay varios candidatos. La máxima expresión ocurrió cuando aumentaba la densidad celular, lo que hace pensar que podría estar involucrada una molécula señal dependiente de la densidad celular. La cepa serotipo 5 de *A. pleuropneumoniae* produce una molécula señal de *quorum sensing* que es análoga a la señal tipo furanona de *Vibrio harveyi* (Malott y Lo, 2002). Este sistema de señales depende del producto del gen *luxS*, y en la familia *Pasteurellaceae* se han identificado homólogos de *luxS* incluyendo una cepa de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 (Malott y Lo, 2002; Sheehan et al., 2003; Jarma y Regassa, 2004). La leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans* parece estar regulada positivamente por un

sistema de señales dependiente de LuxS (Fong et al., 2001). Por otra parte, al aumentar la densidad celular tanto *in vivo* como *in vitro* se producen numerosos cambios en el medio ambiente que podrían actuar como señales para alterar la expresión genética. Una de ellas podría ser la disponibilidad de oxígeno. Esta disminuye al aumentar la densidad celular, lo que forzaría a muchas células a crecer en condiciones anaerobias. No obstante, tanto el nivel global como el patrón de actividad de la toxina Apx son idénticos en cultivos aeróbicos y anaeróbicos, al igual que ocurre con la producción de las proteínas ApxI y ApxII, y con la concentración de ARNm *apxII*. La conclusión a la que se llega es que la regulación de *apxI* y *apxII* dependiente de la fase de crecimiento no depende de la limitación de oxígeno (Jarma et al., 2004). Este tipo de regulación es similar a la observada en el gen *lktA* de *Mannheimia haemolytica* (Marciel y Highlander, 2001), pero diferente del patrón de producción de la α -hemolisina de *E. coli* y de la leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans*, que se producen principalmente bajo condiciones de crecimiento anaeróbicas (Mouriño et al., 1994; Inoue et al., 2001). Por último, la disponibilidad de nutrientes y cofactores, tales como el hierro, también podrían servir como señales que modificaran la expresión de los genes *apx* (Jarma y Regassa, 2004).

Visto el interés que suscita la producción de bacteriocinas por bacterias del suelo como factor que influye en la competitividad por la nodulación de las raíces de plantas leguminosas, se consideró conveniente profundizar en el estudio a nivel genético y molecular de la bacteriocina producida por la cepa Z25 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Rodelas et al., 1998).

2. OBJETIVOS

La inoculación de leguminosas con cepas de *Rhizobium* seleccionadas por sus mejores capacidades de fijación de nitrógeno y/o nodulación frecuentemente no origina resultados satisfactorios. Este fracaso se debe a que las cepas autóctonas del suelo están mejor adaptadas a las condiciones del nicho ecológico, y terminan desplazando al inoculante (Dowling y Broughton, 1986; Triplett y Sadowsky, 1992).

La producción de bacteriocinas (rizobiocinas) por cepas del género *Rhizobium* ha sido señalada reiteradamente como un factor muy influyente en la capacidad competitiva, así como una característica susceptible de manipulación para la construcción de cepas mejoradas. Así, como se ha detallado en el apartado 1.2.3.2 de la Introducción, Schwinghamer y Belkengren (1968) describieron la cepa *R. leguminosarum* bv. *trifolii* T24 (Fix⁻), que produce una sustancia antibacteriana denominada trifolitoxina (Triplett y Barta, 1987), cuya producción está codificada por los genes *tfx*. La introducción de los genes *tfx* de forma estable en el genoma de cepas Fix⁺ de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ha permitido construir artificialmente cepas altamente competitivas (Triplett, 1990). Otra rizobiocina bien caracterizada es la producida por *R. leguminosarum* cepa 248, que presenta homología con las toxinas RTX y que tiene efecto en la competitividad por la nodulación de guisante cuando se ensaya frente a diferentes cepas (Oresnik et al., 1999).

Como parte de un estudio más amplio sobre interacción entre microorganismos de la rizosfera del haba común (*Vicia faba* L.) y dentro de un proyecto subvencionado por el Programa Nacional de Investigación Agrícola (AGRI91-0714), el grupo de Microbiología Ambiental de la Universidad de Granada efectuó una búsqueda de cepas de *R. leguminosarum* bv. *viciae* productoras de rizobiocinas. Se aisló la cepa Z25 (CECT 4585), que mostró una potente actividad bacteriocinogénica frente a todas las cepas de *R. leguminosarum* bv. *viciae* utilizadas como indicadores, sin efectos inhibitorios sobre otros grupos de microorganismos del suelo (Rodelas et al., 1998). Estos resultados sugieren que la cepa Z25 produce una rizobiocina con un espectro de acción restringido a la cepas con

las que puede competir directamente por la nodulación, sin afectar a otros microorganismos saprofitos o beneficiosos de la rizosfera.

Se conoce la naturaleza proteica de la rizobiocina producida por la cepa Z25 y algunas de sus propiedades físico-químicas (Rodelas et al., 1998). No obstante, sería de gran interés completar su caracterización a nivel molecular. La caracterización de los genes responsables de su expresión y el avance en la comprensión de los mecanismos que la regulan proporcionarían las herramientas necesarias para la construcción de derivados de esta cepa mejorados en la competitividad, así como la posibilidad de introducir el ADN determinante de la producción de rizobiocina en otras cepas.

Son numerosas las especies bacterianas que monitorizan la densidad de sus poblaciones mediante el sistema de comunicación intercelular conocido como percepción de quórum, que requiere la acumulación en el medio de compuestos señal permeables a través de la membrana celular. En el caso de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, se han descrito homólogos de *luxI* y *luxR* que regulan la expresión de genes en la rizosfera (Cubo et al., 1992, Rodelas et al., 1999). No obstante, en *R. leguminosarum* bv. *viciae* existen varias parejas de genes homólogos de *luxIR* que actúan en cascada, de forma que la densidad celular de la población determina la expresión de múltiples genes implicados en diferentes procesos, de manera simultánea o incluso dentro de una secuencia necesaria (Lithgow et al., 2000). Por tanto, sería de interés determinar si existe implicación de un sistema de estas características en la regulación de la producción de rizobiocina por la cepa Z25.

Se han establecido los siguientes objetivos para la obtención de conclusiones significativas al término de la investigación:

1. Obtención de cepas mutantes derivadas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* cepa Z25 no productoras de rizobiocina. Clonación y secuenciación del

locus/loci codificante de la producción de rizobiocina en el genoma de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* cepa Z25.

2. Aislamiento y secuenciación de genes homólogos de *luxR/luxI* en el genoma de la cepa Z25. Obtención de mutantes de la cepa Z25 alteradas en la producción de acil-homoserina lactonas (AHLs).
3. Estudio de la expresión de los genes de la rizobiocina. Influencia del mecanismo de percepción de quórum en el proceso.
4. Estudio comparativo de la relación entre la producción de rizobiocina y la capacidad competitiva y eficiencia simbiótica (nodulación y fijación simbiótica de nitrógeno) en la cepa Z25 y las mutantes derivadas de ella.

Estos resultados permitirán evaluar el papel de las bacteriocinas en la capacidad competitiva de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* cepa Z25, así como ampliar el conocimiento sobre las posibilidades de aplicación de las cepas productoras de bacteriocinas en la mejora de la competitividad de los inoculantes de *Rhizobium*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

3.1.1. Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas de *Rhizobium leguminosarum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Azospirillum brasilense*, *Chromobacterium violaceum* y *Escherichia coli*, y los plásmidos empleados en este trabajo, junto con sus características más importantes, se recogen en la Tabla 3.1 y en la Tabla 3.2 respectivamente:

Tabla 3.1: Cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Azospirillum brasilense*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Chromobacterium violaceum* y *Escherichia coli* empleadas en este estudio.

Cepas	Características relevantes	Fuente o referencia
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>:		
Z25	Fix ⁺ , Nod ⁺ , Bac ⁺ .	Rodelas et al., 1998.
Z25 Sm ^r	Mutante espontánea resistente a estreptomycin de la cepa Z25. Sm ^r .	Belén Rodelas (comunicación personal).
225	Z25 <i>rzcA1</i> ::Tn5, Bac ⁻ . Km ^r , Sm ^r .	Este trabajo.
1827	Z25 <i>rzcA2</i> ::Tn5, Bac ⁻ . Km ^r , Sm ^r .	Este trabajo.
4420	Z25 <i>rzcA3</i> ::Tn5, Bac ⁻ . Km ^r , Sm ^r .	Este trabajo.
5025	Z25 <i>rzcA4</i> ::Tn5, Bac ⁻ . Km ^r , Sm ^r .	Este trabajo.
1626	Z25 <i>rzcA5</i> ::Tn5, Bac reducida. Km ^r , Sm ^r .	Este trabajo.
M17	Fix ⁺ , Nod ⁺ .	Rodelas et al., 1998.
M17 Sp ^r	Mutante espontánea resistente a espectinomycin de la cepa M17. Sp ^r .	Este trabajo.
Z25- <i>rzcC</i> ⁻	Z25 <i>rzcC</i> ::Gm, Bac ⁻ . Gm ^r , Sm ^r .	Este trabajo.
Z25-ORF3 ⁻	Z25 ORF3::Gm. Gm ^r , Sm ^r .	Este trabajo.
Z25-ΔpORF3	Mutante de la cepa Z25 por delección de un fragmento <i>Hind</i> III de 862 pb que flanquea en 5' al ORF3. Sm ^r .	Este trabajo.
Z25-ΔpORF3::Gm	Z25-ΔpORF3 con un gen de resistencia a la Gm (0,86 kb) insertado en el sitio <i>Hind</i> III. Gm ^r , Sm ^r .	Este trabajo.
Z25- <i>cinI</i> ⁻	Z25 <i>cinI</i> ::Gm. Gm ^r , Sm ^r .	Este trabajo.
A34 (8401 pRL1JI)	Cepa control para la electroforesis de megaplásmidos y la producción de AHLs. Sm ^r .	Downie et al., 1985.

Tabla 3.1. Continuación.

Cepas	Características relevantes	Fuente o referencia
<i>Agrobacterium tumefaciens:</i>		
NTL4 pZLR4	Cepa derivada de NT1, detectora de AHLs; <i>traR</i> , <i>traG::lacZ</i> . Ap ^r , Gm ^r .	Luo et al., 2001.
<i>Azospirillum brasilense:</i>		
Sp7 (ATCC 29145)	Cepa control para la electroforesis de megaplásmidos.	Plazinski et al., 1983.
<i>Chromobacterium violaceum:</i>		
CV026	Cepa derivada de ATCC 31532, detectora de AHLs; <i>cviI::Tn5xylE</i> . Km ^r , Sm ^r .	McClellan et al., 1997.
<i>Escherichia coli:</i>		
S17.1	<i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>recA</i> , <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7. Sm ^r , Sp ^r , Tp ^r .	Simon et al., 1983.
DH5 α	<i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K⁻ m_K⁺</i>), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>) _{U169} , (<i>m80lacZAM15</i>), <i>f80</i> .	Sambrook et al., 1989.
TP2021	F ⁻ <i>xyl</i> Δ <i>lacX74 argH1</i>	Krin et al., 2002
BE1522	F ⁻ <i>xyl</i> Δ <i>lacX74 argH1 hns-1001::Tn5seq1</i>	Krin et al., 2002

Tabla 3.2: Plásmidos empleados.

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pBluescript II KS (-)	Vector de clonación; <i>lacZ</i> , <i>ori fl</i> , <i>ori ColE1</i> . Ap ^r .	Stratagene®
pSUP2021	Vector de clonación derivado de pBR325 que porta Tn5 para mutagénesis al azar; <i>mob</i> . Ap ^r , Cm ^r , Km ^r , Tc ^r .	Simon et al., 1983.
pMP220	Vector de clonación para construir fusiones transcripcionales con el gen <i>lacZ</i> . Tc ^r .	Spaink et al., 1987.
pK18 <i>mobsacB</i>	Vector de clonación derivado de pBR322 para llevar a cabo recombinaciones dobles; RP4 <i>mob</i> , <i>lacZα</i> , <i>sacB</i> . Km ^r .	Schäfer et al., 1994.
pGEM®-T	Vector para clonar productos de PCR; <i>lacZ</i> , <i>ori fl</i> . Ap ^r .	Promega®
pRK2013	Vector empleado para realizar conjugaciones triparentales; <i>mob</i> , <i>tra</i> , Tn903, <i>ori ColE1</i> . Km ^r .	Figurski y Helinski, 1979.
pUCGM	Vector de clonación portador del gen de resistencia a la gentamicina. Ap ^r , Gm ^r .	Schweizer, 1993.

Tabla 3.2. Continuación.

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pMAGR1	Fragmento <i>EcoRI-BamHI</i> de 5 kb de la mutante 225 clonado en pBluescript II KS (-). Contiene parte del gen <i>rzcA1::Tn5</i> . Ap ^r , Km ^r .	Este trabajo.
pMAGR2	Fragmento <i>EcoRI-BamHI</i> de 11,6 kb de la mutante 1827 clonado en pBluescript II KS (-). Contiene parte del gen <i>rzcA2::Tn5</i> . Ap ^r , Km ^r .	Este trabajo.
pMAGR3	Δ <i>SacI</i> de pMAGR1. Ap ^r .	Este trabajo.
pMAGR4	Δ <i>EcoRV</i> de pMAGR1. Ap ^r , Km ^r .	Este trabajo.
pMAGR5	Δ <i>ClaI</i> de pMAGR2. Ap ^r , Km ^r .	Este trabajo.
pMAGR6	Δ <i>PstI-XbaI</i> de pMAGR5. Ap ^r .	Este trabajo.
pMAGR7	Fragmento <i>EcoRI-BamHI</i> de 15 kb de la mutante 4420 clonado en pBluescript II KS (-). Contiene parte del gen <i>rzcA3::Tn5</i> . Ap ^r , Km ^r .	Este trabajo.
pMAGR8	Fragmento <i>EcoRV</i> de 5 kb de pMAGR5 clonado en pBluescript II KS (-). Ap ^r .	Este trabajo.
pMAGR9	Δ <i>HindIII</i> de pMAGR8. Ap ^r .	Este trabajo.
pMAGR10	Δ <i>SacII</i> de pMAGR8. Ap ^r .	Este trabajo.
pMAGR11	Fragmento <i>ClaI</i> de 8 kb de pMAGR7 clonado en pBluescript II KS (-). Ap ^r .	Este trabajo.
pMAGR12	Fragmento <i>HindIII</i> de 2,7 kb de pMAGR8 clonado en pBluescript II KS (-). Ap ^r .	Este trabajo.
pMAGR13	Fragmento <i>SacI</i> de 12,4 kb de la mutante 4420 clonado en pBluescript II KS (-). Contiene parte del gen <i>rzcA3::Tn5</i> . Ap ^r , Km ^r .	Este trabajo.
pMAGR14	Fragmento <i>PstI</i> de 4,6 kb de pMAGR11 clonado en pBluescript II KS (-). Ap ^r .	Este trabajo.
pMAGR15	Δ <i>EcoRI</i> de pMAGR13. Ap ^r .	Este trabajo.
pMAGR16	Fragmento <i>EcoRI-BamHI</i> de 4,7 kb de pMAGR14 clonado en pMP220. Fusión transcripcional <i>rzcA-lacZ</i> con los genes <i>rzcC</i> y ORF3 flanqueando. Tc ^r .	Este trabajo.
pMAGR17	Fragmento <i>HindIII</i> de 2,7 kb de pMAGR12 clonado en pMP220. Fusión transcripcional <i>rzcA-lacZ</i> con el gen <i>rzcC</i> flanqueando. Tc ^r .	Este trabajo.

Tabla 3.2. Continuación.

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pMAGR18	$\Delta RsrII$ - <i>ApaI</i> de pMAGR12. Ap ^r .	Este trabajo.
pMAGR19	$\Delta RsrII$ - <i>EcoRV</i> de pMAGR14. Ap ^r .	Este trabajo.
pMAGR20	Fragmento <i>EcoRI</i> - <i>KpnI</i> de 1,4 kb de pMAGR18 clonado en pMP220. Fusión transcripcional <i>rzcC-lacZ</i> . Tc ^r .	Este trabajo.
pMAGR21	Fragmento <i>KpnI</i> - <i>XbaI</i> de 1,9 kb de pMAGR19 clonado en pMP220. Fusión transcripcional <i>rzcA-lacZ</i> . Tc ^r .	Este trabajo.
pMAGR22	Fragmento <i>HindIII</i> de 0,86 kb de pMAGR14 clonado en pMP220. Fusión transcripcional ORF3- <i>lacZ</i> . Tc ^r .	Este trabajo.
pMAGR23	Fragmento <i>ClaI</i> de 2,8 kb de pMAGR15 clonado en pBluescript II KS (-). Ap ^r .	Este trabajo.
pMAGR24	Fragmento <i>ClaI</i> de 2,4 kb de pMAGR15 clonado en pBluescript II KS (-). Ap ^r .	Este trabajo.
pMAGR25	$\Delta RsrII$ - <i>BamHI</i> de pMAGR14. Ap ^r .	Este trabajo.
pMAGR26	pMAGR12 con un gen de resistencia a la gentamicina (fragmento <i>SmaI</i> de 0,86 kb de pUCGm) clonado en romo en un sitio <i>RsrII</i> . Contiene el gen <i>rzcC::Gm</i> con el gen de resistencia a la gentamicina en orientación contraria al gen <i>rzcC</i> . Ap ^r , Gm ^r .	Este trabajo.
pMAGR27	Fragmento <i>SalI</i> - <i>EcoRI</i> de 3,7 kb de pMAGR26 clonado en pK18 <i>mobsacB</i> . Gm ^r , Km ^r .	Este trabajo.
pMAGR28	Fragmento <i>HindIII</i> de 3,7 kb de pMAGR26 clonado en pK18 <i>mobsacB</i> . Gm ^r , Km ^r .	Este trabajo.
pMAGR29	Fragmento <i>KpnI</i> - <i>XbaI</i> de 2,8 kb de pMAGR25 clonado en pMP220. Fusión transcripcional <i>rzcC-lacZ</i> con el ORF3 flanqueando. Tc ^r .	Este trabajo.
pMAGR30	$\Delta SphI$ - <i>XhoI</i> de pMAGR25. Ap ^r .	Este trabajo.
pMAGR31	pMAGR30 con un gen de resistencia a la gentamicina (fragmento <i>SmaI</i> de 0,86 kb de pUCGm) clonado en romo en un sitio <i>HindIII</i> . Contiene el ORF3::Gm con el gen de resistencia a la gentamicina en orientación contraria al ORF3. Ap ^r , Gm ^r .	Este trabajo.
pMAGR32	pMAGR30 con un gen de resistencia a la gentamicina (fragmento <i>SmaI</i> de 0,86 kb de pUCGm) clonado en romo en un sitio <i>HindIII</i> . Contiene el ORF3::Gm con el gen de resistencia a la gentamicina en la misma orientación que ORF3. Ap ^r , Gm ^r .	Este trabajo.
pMAGR33	Fragmento <i>NotI</i> - <i>EcoRI</i> de 13 kb de la cepa Z25 clonado en pBluescript II KS (-). Contiene la región <i>rzc</i> incompleta. Ap ^r .	Este trabajo.

Tabla 3.2. Continuación.

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pMAGR34	Fragmento <i>ApaI-XbaI</i> de 2,9 kb de pMAGR31 clonado en romo en pK18 <i>mobsacB</i> . Gm ^r , Km ^r .	Este trabajo.
pMAGR35	Δ <i>ClaI-EcoRV</i> de pMAGR25 (para quitar un sitio <i>HindIII</i> del sitio de clonación múltiple). Ap ^r .	Este trabajo.
pMAGR36	Δ <i>HindIII</i> de pMAGR35. Delección de la región en 5' del ORF3 (Δ pORF3) de manera que queda fusionado con el gen de la integrasa. Ap ^r .	Este trabajo.
pMAGR37	Fragmento <i>KpnI-XbaI</i> de 1,9 kb de pMAGR36 clonado en pMP220. Fusión transcripcional <i>rzcC-lacZ</i> con Δ pORF3. Tc ^r .	Este trabajo.
pMAGR38	Fragmento <i>EcoRI-XbaI</i> de 1,94 kb de pMAGR36 clonado en pK18 <i>mobsacB</i> . Km ^r .	Este trabajo.
pMAGR39	Producto de la amplificación por PCR de los genes <i>cinRI</i> (2,2 kb) a partir del ADN de la cepa Z25, clonado en pBluescript II KS (-). Ap ^r .	Este trabajo.
pMAGR40	Producto de la amplificación por PCR inversa a partir del ADN de la cepa Z25 de un fragmento <i>SacI-EcoRI</i> de 7 kb clonado en pGEM®-T. Contiene parte del gen <i>rzcA</i> y los genes del sistema de transporte <i>rzcDEF</i> . Ap ^r .	Este trabajo.
pMAGR41	Fragmento <i>EcoRI-XbaI</i> de 4,6 kb de pMAGR14 clonado en el fragmento <i>EcoRI-XbaI</i> de 2,9 kb de pMAGR36 (correspondiente al vector pBluescript II KS (-) sin el sitio <i>HindIII</i> en el sitio de clonación múltiple). Ap ^r .	Este trabajo.
pMAGR42	Δ <i>HindIII</i> de pMAGR41 con el propósito de eliminar la región en 5' del ORF3 (Δ pORF3). Ap ^r .	Este trabajo.
pMAGR43	Fragmento <i>KpnI-XbaI</i> de 3,8 kb de pMAGR42 clonado en pMP220. Fusión transcripcional <i>rzcA-lacZ</i> con Δ pORF3. Tc ^r .	Este trabajo.
pMAGR44	pMAGR36 con un gen de resistencia a la gentamicina (fragmento <i>SmaI</i> de 0,86 kb de pUCGm) clonado en romo en un sitio <i>HindIII</i> . Contiene la Δ pORF3::Gm con el gen de resistencia a la gentamicina en orientación contraria al gen <i>rzcC</i> . Ap ^r , Gm ^r .	Este trabajo.
pMAGR45	pMAGR36 con un gen de resistencia a la gentamicina (fragmento <i>SmaI</i> de 0,86 kb de pUCGm) clonado en romo en un sitio <i>HindIII</i> . Contiene la Δ pORF3::Gm con el gen de resistencia a la gentamicina en la misma orientación que el gen <i>rzcC</i> . Ap ^r , Gm ^r .	Este trabajo.
pMAGR46	pMAGR39 con un gen de resistencia a la gentamicina (fragmento <i>SmaI</i> de 0,86 kb de pUCGm) clonado en romo en un sitio <i>SphI</i> . Contiene el gen <i>cinI</i> ::Gm con el gen de resistencia a la gentamicina en orientación contraria al gen <i>cinI</i> . Ap ^r , Gm ^r .	Este trabajo.

Tabla 3.2. Continuación.

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pMAGR47	pMAGR39 con un gen de resistencia a la gentamicina (fragmento <i>SmaI</i> de 0,86 kb de pUCGm) clonado en romo en un sitio <i>SphI</i> . Contiene el gen <i>cinI::Gm</i> con el gen de resistencia a la gentamicina en la misma orientación que el gen <i>cinI</i> . Ap ^r , Gm ^r .	Este trabajo.
pMAGR48	Fragmento <i>EcoRI-XbaI</i> de 2,8 kb de pMAGR44 clonado en pK18 <i>mobsacB</i> . Km ^r .	Este trabajo.
pMAGR49	Fragmento <i>NotI</i> romo- <i>SmaI</i> de 3 kb de pMAGR46 clonado en pK18 <i>mobsacB</i> . Km ^r .	Este trabajo.
pMAGR50	Producto de la amplificación por PCR del ADN de la cepa Z25 (1,5 kb), clonado en pMP220. Fusión transcripcional <i>rzcC-lacZ</i> con el gen ORF3 flanqueando. Tc ^r .	Este trabajo.
pMAGR52	Producto de la amplificación por PCR del ADN de la cepa Z25 (1,88 kb) clonado en pMP220. Fusión transcripcional <i>rzcC-lacZ</i> con parte del gen de la integrasa y el gen ORF3 flanqueando. Tc ^r .	Este trabajo.
pMAGR54	Producto de la amplificación por PCR del ADN de la cepa Z25 (2,09 kb) clonado en pMP220. Fusión transcripcional <i>rzcC-lacZ</i> con parte del gen de la integrasa y el gen ORF3 flanqueando. Tc ^r .	Este trabajo.
pMAGR55	Fragmento <i>EcoRI-XbaI</i> de 2,8 kb de pMAGR44 clonado en pMP220. Fusión transcripcional <i>rzcC-lacZ</i> con Δ pORF3:: <i>Gm</i> con el gen de resistencia a la gentamicina en orientación contraria al gen <i>rzcC</i> . Gm ^r , Tc ^r .	Este trabajo.
pMAGR56	Fragmento <i>EcoRI-XbaI</i> de 2,8 kb de pMAGR45 clonado en pMP220. Fusión transcripcional <i>rzcC-lacZ</i> con Δ pORF3:: <i>Gm</i> con el gen de resistencia a la gentamicina en la misma orientación que el gen <i>rzcC</i> . Gm ^r , Tc ^r .	Este trabajo.
pMAGR57	Fragmento <i>KpnI-BamHI</i> de 1,8 kb de pMAGR40 clonado en pMP220. Fusión transcripcional <i>rzcD-lacZ</i> . Tc ^r .	Este trabajo.
pMAGR59	Producto de la amplificación por PCR del ADN de la cepa Z25 (2,67 kb) clonado en pMP220. Fusión transcripcional <i>rzcC-lacZ</i> con el gen de la integrasa y el gen ORF3 flanqueando. Tc ^r .	Este trabajo.
pMAGR60	Fragmento <i>BamHI</i> de 3 kb de pMAGR40 clonado en pBluescript II KS (-). Contiene parte del gen <i>rzcD</i> y los genes <i>rzcE</i> y <i>rzcF</i> . Ap ^r .	Este trabajo.
pMAGR61	Δ <i>PstI</i> de pMAGR24. Ap ^r .	Este trabajo.

En las figuras 3.1 y 3.2 se puede ver un mapa de los plásmidos construidos en este trabajo derivados de pBluescript II KS (-) y pGEM®-T, y derivados de pMP220, respectivamente.

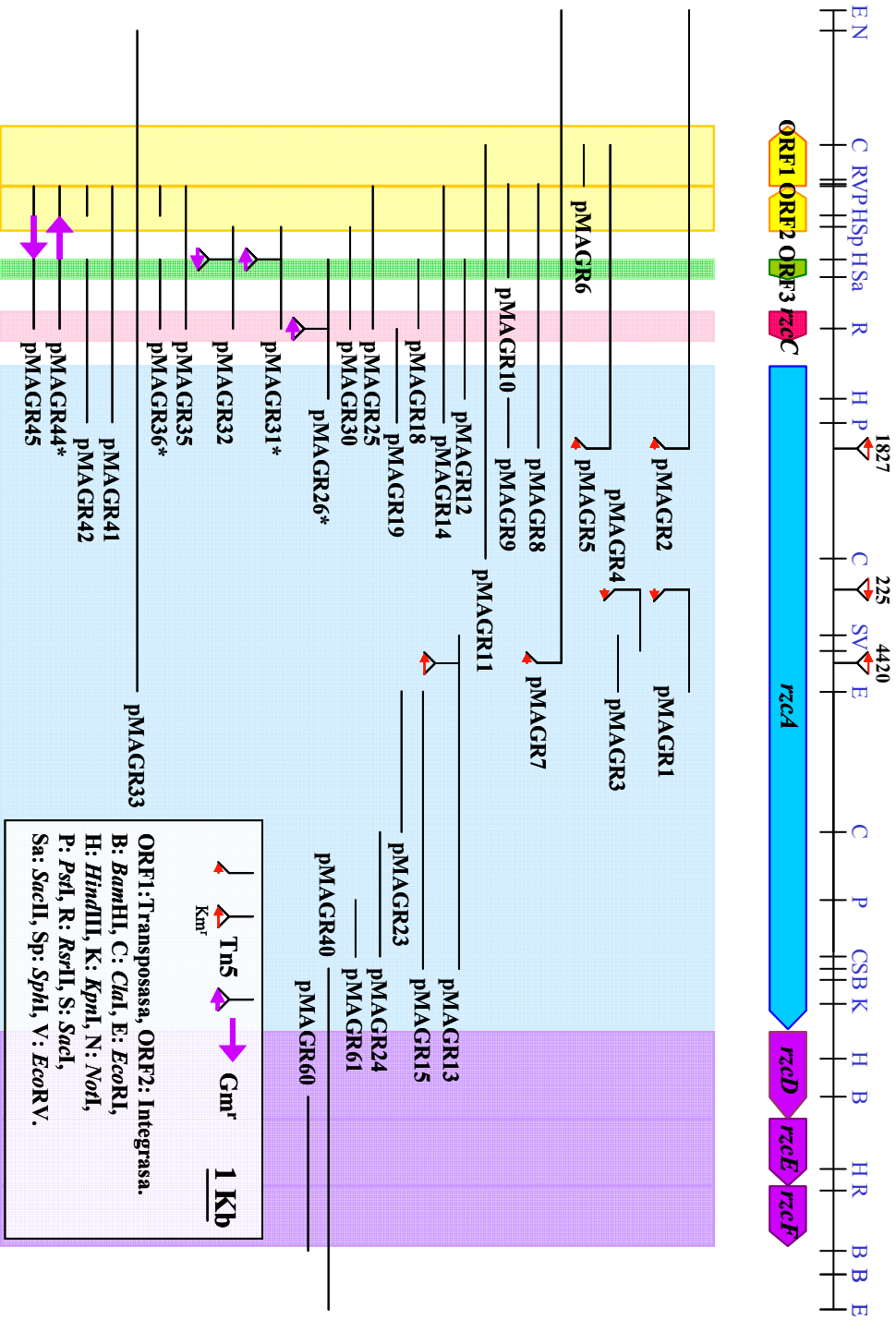


Figura 3.1: Mapa de los plásmidos derivados de pBluescript II KS (-) y pGEM®-T (pMAGR40) construidos en este trabajo. Los plásmidos señalados con un asterisco (*) se emplearon para hacer subclones con el plásmido pK18mob^{sacB}. En el caso de las enzimas de restricción que tienen más de cinco dígitos en la secuencia (enzimas *ClaI*, *EcoRV*, *KpnI*, *PstI*, *SacI*, *SacII* y *SphI*), solo se han indicado los sitios de interés.

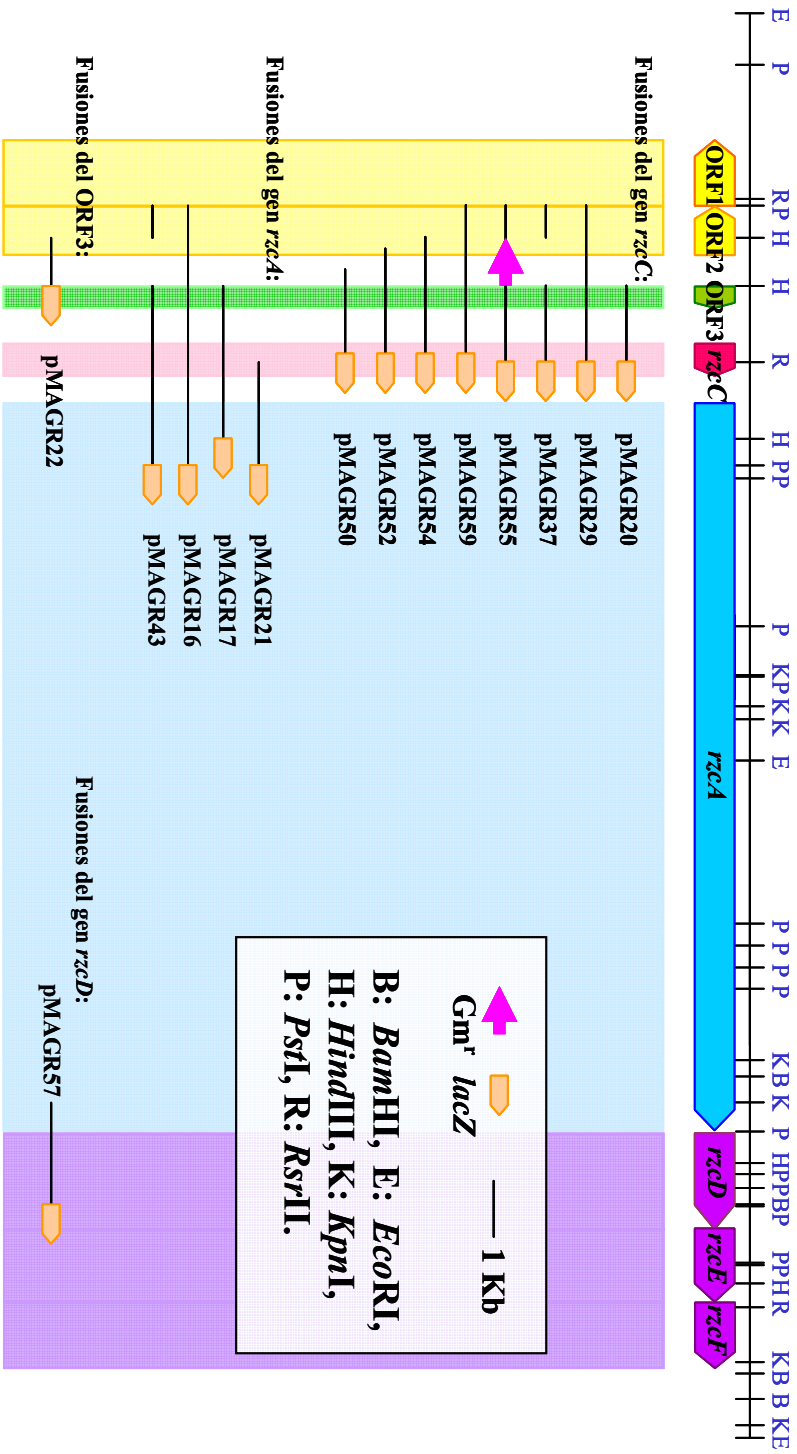


Figura 3.2: Mapa de los plásmidos derivados de pMMP220 construidos en este trabajo. ORF1: transposasa, ORF2: integrasa.

3.1.2. Medios de cultivo

Para las cepas de *E. coli* se empleó el medio LB (Luria-Bertani) de manera rutinaria:

Medio Luria-Bertani LB (Sambrook et al., 1989): NaCl, 10 g; triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; agua destilada, 1 litro. Para preparar medio sólido se debe añadir agar a una concentración de 15 g/L. El medio fue esterilizado en autoclave a 115°C durante 30 minutos. El cultivo de células de *E. coli* se llevó a cabo a 37°C, y cuando se trató de cultivos en medio líquido estos se incubaron con agitación a 150 r.p.m.

Para las cepas de *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Agrobacterium* y *Chromobacterium* se emplearon los siguientes medios:

Medio completo TY (Beringer, 1974): Triptona, 5 g; extracto de levadura, 3 g; CaCl₂ · 6 H₂O, 1,3 g; agua destilada, 1 litro. Para preparar medio sólido se debe añadir agar a una concentración de 15 g/L. Para el ensayo de detección de la producción de bacteriocinas se empleó una concentración de agar de 20 g/L.

Medio mínimo Y optimizado para la producción de bacteriocinas (Rodelas et al., 1998): Manitol, 5 g; K₂HPO₄, 0,22 g; MgSO₄ · 7 H₂O, 0,10 g; FeCl₃, 0,02 g; CaCl₂, 0,04 g; KNO₃, 0,60 g; Na₂MoO₄ · 2 H₂O, 0,0002 g; stock de vitaminas, 10 mL; agua destilada, c.s.p. 1 litro. Stock de vitaminas: HCl de tiamina, 10 mg; pantotenato cálcico, 10 mg; biotina, 10 mg; tampón K₂HPO₄/ KH₂PO₄ 0,05 M pH 7, 100 mL. El *stock* de vitaminas se esteriliza por filtración empleando unidades de filtración de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0,20 µm (Albet®). Se mantiene congelado a -20°C,

y se añade al medio una vez estéril tras enfriarlo a una temperatura próxima a los 50°C. Para preparar medio sólido se debe añadir agar a una concentración de 19,4 g/L.

Medio AB para la detección de AHLs por *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 pZLR4 (Shaw et al., 1997): Sales AB 20x, 2,5 mL; tampón AB 20x, 2,5 mL; manitol 10%, 1 mL; agua destilada, c.s.p. 50 mL. Sales AB 20x: NH₄Cl, 20 g; MgSO₄ · 7 H₂O, 6 g; KCl, 3 g; CaCl₂, 0,2 g; FeSO₄ · 7 H₂O, 50 mg; agua destilada, c.s.p. 1 litro. Tampón AB 20x (pH 7): K₂HPO₄, 60 g; NaH₂PO₄, 23 g; agua destilada, c.s.p. 1 litro. Para preparar medio sólido se debe añadir agar a una concentración de 15 g/L.

Estos medios fueron esterilizados en autoclave a 115 °C durante 30 minutos. El cultivo de células de *Rhizobium leguminosarum*, *Azospirillum brasilense*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Chromobacterium violaceum* se llevó a cabo a 28°C, y cuando se trató de cultivos en medio líquido estos se incubaron con agitación a 150 r.p.m.

3.1.3. Antibióticos

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se hizo a partir de soluciones madre de éstos en agua destilada. Las soluciones madre se esterilizaron mediante unidades de filtración de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0,20 µm (Albet®) y se conservaron a -20°C. La excepción es la tetraciclina, cuya solución madre se preparó en etanol al 70% y además no fue necesario esterilizarla por filtración. Este antibiótico se mantuvo en la oscuridad ya que es fotosensible y se conservó a -20°C. La concentración final de los antibióticos en los respectivos medios aparece en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3: Concentración en µg/mL de los antibióticos empleados para las cepas de *Rhizobium leguminosarum* y *Escherichia coli* respectivamente.

Antibiótico	Concentración (µg/mL)	
	<i>R. leguminosarum</i>	<i>E. coli</i>
Estreptomina (Sm)	400	—
Kanamicina (Km)	200	25-50
Ampicilina (Ap)	—	200-400
Espectinomicina (Sp)	200	—
Gentamicina (Gm)	10-15	10-15
Tetraciclina (Tc)	5	5

3.1.4. Conservación de cepas bacterianas

Para la conservación de cepas bacterianas se emplearon criotubos con glicerol estéril al 20%, a los que se adicionaron suspensiones bacterianas procedentes de cultivos frescos en medio sólido. Se mantuvieron almacenados a -80°C, y las cepas de *E. coli* también se almacenaron a -20°C. En estas condiciones, los cultivos mantienen la viabilidad durante periodos de tiempo superiores a un año.

3.1.5. Mantenimiento de cepas bacterianas

Las cepas de *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Agrobacterium* y *Chromobacterium* se mantuvieron mediante resiembras periódicas en placas de medio TY, y las cepas de *E. coli* mediante resiembras periódicas en placas de medio LB, estando ambos medios suplementados con los antibióticos correspondientes cuando fue necesario.

3.1.6. Ensayo de competición en medio líquido

En primer lugar se inocularon frascos de 10 mL de medio TY con la cepa productora de bacteriocinas Z25 y sus derivadas (4420, Z25-*cinI* y Z25- Δ pORF3) y la cepa sensible a la bacteriocina (M17 Sp^r) a partir de cultivos en placa del mismo medio, y se incubaron a 28°C en un agitador orbital (150 r.p.m.). Al día siguiente se subcultivaron 500 μ L de cada cultivo a frascos de 10 mL de medio TY, y un día más tarde se ajustaron los cultivos a la misma densidad óptica ($DO_{550}=0,9$). A continuación se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio TY con 500 μ L de cultivo de las cepas Z25, 4420, Z25-*cinI* y Z25- Δ pORF3, y después se adicionaron 500 μ L de cultivo de la cepa M17 a todos los matraces anteriores. Estos matraces se incubaron a 28°C con agitación (150 r.p.m.) y se tomaron alícuotas de 1 mL a las 12, 24, 36, 48 y 54 horas para medir la DO_{550} y hacer recuento de colonias por duplicado en placas de TY con los antibióticos a los que son resistentes la cepas Z25 y sus derivadas (Sm) y la cepa sensible a la bacteriocina (Sp).

3.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.2.1. Obtención de ADN plasmídico a partir de cultivos de *Escherichia coli*

La obtención de ADN plasmídico a partir de cultivos de *Escherichia coli* se llevó a cabo siguiendo un protocolo basado en el método de la lisis alcalina (Sambrook et al., 1989):

- 1- Se inocularon 3 mL de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes con la bacteria que se deseaba analizar, y el cultivo se incubó a 37°C con agitación (150 r.p.m.) durante toda la noche.
- 2- El cultivo se centrifugó en un tubo eppendorf durante 1 minuto a 13000 r.p.m., y a continuación se eliminaron todos los restos de sobrenadante mediante el empleo de micropipeta.
- 3- El sedimento resultante se resuspendió en 100 µL de solución I estéril conservada en hielo.
- 4- Se adicionaron 200 µL de solución II y se mezcló suavemente por inversión manual del tubo seis veces.
- 5- Se añadieron 150 µL de solución III estéril conservada en hielo, se mezcló por agitación fuerte, y se mantuvo en hielo de 5 a 30 minutos.
- 6- Se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 5 minutos.
- 7- El sobrenadante se recogió en un tubo eppendorf nuevo y se añadió un volumen de fenol-cloroformo equilibrado con tampón TE. Se mezcló bien y se centrifugó 2 minutos a 13000 r.p.m.
- 8- Se recogió la fase superior acuosa en otro tubo nuevo y se añadió un volumen de cloroformo. Se mezcló bien y se centrifugó 2 minutos a 13000 r.p.m.

- 9- Se recogió la fase superior acuosa en otro tubo nuevo y se precipitó con un volumen de isopropanol. Se mezcló suavemente y se centrifugó 10 minutos a 13000 r.p.m.
 - 10- Se eliminó el sobrenadante, se lavó el precipitado con 500 μ L de etanol al 70%, y se centrifugó 2 minutos a 13000 r.p.m.
 - 11- El etanol se eliminó mediante aspiración con bomba de vacío y se dejó secar el precipitado.
 - 12- Una vez seco, se resuspendió en 25-30 μ L de tampón TE o agua destilada estéril.
-

- Solución I: Glucosa 50 mM; Tris HCl pH 8,0 25 mM; EDTA pH 8,0 10 mM.
- Solución II (extemporánea): SDS 10%, 100 μ L; NaOH 2N, 100 μ L; agua destilada estéril, 800 μ L.
- Solución III: Acetato potásico 5 M, 60 mL; ácido acético glacial, 11,5 mL; agua destilada, 28,5 mL.
- Tampón TE: Tris HCl pH 8,0 10 mM; EDTA pH 8,0 1 mM.
- Fenol-cloroformo equilibrado con TE: mezclar un volumen de fenol equilibrado con TE (Sigma®) con un volumen de cloroformo.

3.2.2. Obtención de ADN total de *Rhizobium*

La obtención de ADN total (genómico) se llevó a cabo siguiendo un protocolo estándar (J. A. Downie, comunicación personal):

- 1- Se cultivó la bacteria en medio TY durante 48 horas a 28°C con agitación (150 r.p.m.).

- 2- Se subcultivaron 10 mL a 100 mL de medio TP (optimizado para disminuir la producción de exopolisacáridos) y se incubó toda la noche a 28°C con agitación (150 r.p.m.).
- 3- Se lavaron las células dos veces con 5 mL de tampón TE 20-sarcosil 0,1% (Las centrifugaciones en estos pasos de lavado fueron de 20 minutos a 3000 r.p.m.).
- 4- Se lavaron las células dos veces con 5 mL de tampón TE 20.
- 5- Las células se resuspendieron en 1 mL de tampón TE-sacarosa 20%.
- 6- Se adicionaron 300 µL de lisozima (5 mg/mL) y 400 µL de EDTA (0,25 M), y a continuación se mezcló.
- 7- Se incubó a 37°C durante 10 minutos.
- 8- Se añadieron 2 mL de agua destilada estéril y 200 µL de SDS (10%), y se mezcló.
- 9- Se adicionaron 50 µL de ARNasa (10 mg/mL) libre de ADNasa.
- 10- Se mezcló y se incubó a 37°C durante 15 minutos. En este punto la solución debía estar clara.
- 11- Se añadieron 50 µL de proteinasa K (10 mg/mL).
- 12- Se mezcló y se incubó a 37°C durante una hora.
- 13- El volumen en este paso debe ser 4 mL. Se extrajo con el mismo volumen de fenol-cloroformo. Se repitió hasta que la interfase estuvo clara (Las centrifugaciones fueron de 15 minutos a 5000 r.p.m.).
- 14- Se precipitó el ADN con etanol y se resuspendió en 200 µL de tampón TE (ver página 119).

- Medio TP: Peptona, 0,4 g; extracto de levadura, 0,05 g; triptona, 0,05 g; MgSO₄ · 7 H₂O, 0,02 g; CaCl₂ · 2 H₂O, 0,02 g; agua destilada, c.s.p. 100 mL.

- Tampón TE 20: Tris 50 mM; EDTA 20 mM; NaCl 1 M; pH 7.

3.2.3. Determinación de la concentración de ADN

Para determinar la concentración de ADN se empleó el método espectrofotométrico (Sambrook et al., 1989). Se midió la absorbancia a 280, 260 y 230 nm de soluciones de ADN en agua destilada estéril o TE, usando como blanco agua destilada estéril o TE respectivamente. Para determinar la pureza de la preparación (que no esté contaminada por proteínas, fenol, polisacáridos...) se calculó la relación A_{260}/A_{280} que debe ser mayor o igual que 1,8 y la relación A_{260}/A_{230} que debe ser mayor o igual que 2,2. La concentración se calcula respecto al valor estándar $A_{260}=1$ para soluciones con 50 $\mu\text{g/mL}$ de ADN de cadena doble. También se estimó la concentración de ADN comparando la fluorescencia de la preparación de ADN y de marcadores de concentración conocida en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio visualizado con luz ultravioleta (Sambrook et al., 1989). Para ello se empleó un equipo de análisis de imágenes Gel Doc 2000 (BIORAD®), equipado con el programa *Quantity One* versión 4.0.3. (BIORAD®).

3.2.4. Digestión total de ADN con enzimas de restricción

La digestión total de ADN con enzimas de restricción se realizó en las condiciones óptimas de temperatura y tampón para cada enzima, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Roche®).

Las digestiones con más de una enzima se llevaron a cabo simultáneamente en el mismo tampón y a la misma temperatura cuando así fue posible. En el caso contrario se realizó primero la digestión con la enzima que requería el tampón de menor fuerza iónica, y a continuación se añadió la segunda enzima con su correspondiente tampón. Cuando esto tampoco fue posible, se hizo una primera digestión con una enzima, y

posteriormente se dializó esta digestión, depositándola durante 20 minutos sobre un filtro Millipore® de nitrocelulosa de 0,025 μm de tamaño de poro suspendido en 20 mL de agua bidestilada estéril. Estos filtros tienen una cara hidrofílica y la otra cara hidrofóbica, lo que permite la diálisis de pequeños volúmenes sin pérdidas.

3.2.5. Extracción de ADN con fenol-cloroformo

La purificación y concentración de preparaciones de ADN con fenol-cloroformo se realizó según la siguiente metodología basada en un protocolo anterior (Ausubel et al., 1999):

- 1- Se añadió agua destilada estéril hasta un volumen de 400 μL .
- 2- Se adicionó un volumen de fenol-cloroformo (ver página 119), y se mezcló bien.
- 3- Se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 5 minutos.
- 4- Se recogió la fase superior acuosa en otro tubo.
- 5- Se añadieron 40 μL de solución III (ver página 119).
- 6- Se adicionó un volumen de isopropanol.
- 7- Se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 10 minutos.
- 8- Se secó el precipitado y se resuspendió en 20-30 μL de agua destilada estéril.

3.2.6. Electroforesis

3.2.6.1. Electroforesis de fragmentos de restricción de ADN, revelado de geles, fotografía y estimación del tamaño molecular de dichos fragmentos

Para la separación de fragmentos de restricción de ADN se realizó electroforesis horizontal en geles de agarosa. Estos geles se prepararon en tampón Tris-Borato-EDTA

(TBE) 1x, el cual también se empleó como tampón de electroforesis. La concentración de agarosa varía dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar (0,7-1,0%). El voltaje empleado fue normalmente de 75 V en tanques de electroforesis pequeños, y de 90 V en tanques grandes. Las muestras se mezclaron con tampón de carga a la concentración 6x, utilizando una proporción 1/6 con el volumen de la muestra de ADN.

Los fragmentos de ADN separados en los geles de agarosa se observaron por tinción de los geles mediante inmersión en una solución de bromuro de etidio (2 µg/mL) en tampón TBE durante 20-45 minutos (en función del grosor y tamaño del gel), y posterior visualización con luz UV en un transiluminador. Las fotografías se realizaron con un equipo de análisis de imágenes Gel Doc 2000 (BIORAD®), equipado con el programa *Quantity One* versión 4.0.3. (BIORAD®).

La estimación del tamaño molecular de los fragmentos de restricción se llevó a cabo gracias a la relación logarítmica existente entre el tamaño molecular relativo (Mr) y la movilidad relativa (Rf) de las moléculas marcadoras de ADN en el gel. Como marcador de tamaño molecular se empleó la escalera de 1 Kb (1 kb *ladder*, Gibco BRL® y 1 kb *ladder*, Bioron GmbH®).

-
- TBE 10x: Tris base, 108 g; ácido bórico, 55 g; EDTA 0,5 M pH 8,0, 40 mL; agua destilada, c.s.p. 1 litro.
 - Tampón de carga 6x: Azul de bromofenol 0,25%; TBE 6x; glicerol 30%.

3.2.6.2. Electroforesis para detección de plásmidos y megaplásmidos en sistema horizontal por el método “Back trap”

Se siguió el protocolo de electroforesis de Eckhardt (1978) modificado por Wheatcroft et al. (1990):

- 1- Se cultivaron las bacterias en 10 mL de medio con agitación (150 r.p.m.) a la temperatura adecuada durante toda la noche [en el caso de *Rhizobium* se empleó el medio TP (ver página 120), que disminuye la producción de exopolisacárido, y la incubación se realizó a 28°C].
- 2- Se preparó un gel de agarosa del 0,75%, se introdujo el tanque de electroforesis en un baño de hielo y a continuación se colocó el gel en el tanque junto con tampón TBE teniendo cuidado de que éste no cubriera el gel.
- 3- Se tomó 1 mL de cultivo ajustado a una DO_{600} de 0,2 (cuando fue necesario se hizo una dilución con solución salina estéril).
- 4- Se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 3 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante.
- 5- El sedimento se resuspendió en 500 µL de agua destilada estéril a 4°C con el vórtex y se añadió con cuidado 1 mL de N-lauril sarcosinato sódico al 0,3% a 4°C.
- 6- Se centrifugó inmediatamente a 13000 r.p.m. durante 3 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante.
- 7- El sedimento se resuspendió en 40 µL de Tris 10 mM - EDTA 10 mM - Ficoll 20% (400.000).
- 8- Se agitó durante 10 segundos en el vórtex y se dejó 15 minutos en hielo.
- 9- Mientras tanto se cargaron los pocillos del gel con 25 µL de SDS 10% - Azul xileno (1 mg/mL), y se hizo migrar durante 10-15 minutos a 100 V con la

polaridad a la inversa de manera que el SDS migrara 1 cm por encima de los pocillos.

- 10- Se preparó la solución de lisis: 25 μ L de lisozima extemporánea (10 mg/mL) en un tubo eppendorf con 230 μ L de Tris 10 mM - EDTA 10 mM - ARNasa A (0,4 mg/mL) - Azul de bromofenol (1mg/mL).
- 11- Se adicionaron 10 μ L de solución de lisis a 40 μ L de cada muestra, se mezcló tres veces con la micropipeta y se cargaron de inmediato 25 μ L en cada pocillo.
- 12- Se corrió el gel a 4°C durante 1 hora a 40 V para que el SDS regresara lentamente a los pocillos y a continuación se subió a 100 V durante 3 horas o bien se corrió el gel toda la noche a menor voltaje para obtener una mejor resolución.
- 13- Por último, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (2 μ g/mL) en TBE y se visualizó con luz UV en un transiluminador.

3.2.7. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Tras separar los fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa y teñir el gel con bromuro de etidio, las bandas de ADN se visualizaron con luz UV en un transiluminador y las bandas seleccionadas se escindieron del gel con una espátula. Los fragmentos de ADN se recuperaron de la agarosa mediante el sistema QIAEX® II (Qiagen®), de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 1- Se colocó la banda escindida del gel en un tubo eppendorf y se pesó la muestra.
- 2- Se añadieron 3 volúmenes de tampón QX1® cuando el fragmento de ADN fue de 100 pb a 4 kb, o 3 volúmenes de tampón QX1® y 2 volúmenes de agua destilada estéril cuando fue mayor de 4 kb. El tampón QX1® contiene altas concentraciones de agentes caotrópicos.

- 3- Se agitó la resina Qiaex II® mediante vórtex durante 30 segundos y se adicionaron 10 µL de la resina al tubo del paso anterior. Se mezcló y se incubó a 50°C hasta conseguir la disolución de la agarosa (10 minutos), agitando el tubo cada dos minutos.
- 4- Se centrifugó durante 30 segundos a 14000 r.p.m., se eliminó el sobrenadante con ayuda de una micropipeta y se resuspendió el precipitado en 500 µL de tampón QX1®.
- 5- Se lavó dos veces el precipitado con 500 µL de tampón PE®, que contiene etanol para eliminar los agentes caotrópicos.
- 6- El precipitado se secó a temperatura ambiente evitando una desecación excesiva.
- 7- Se resuspendió el precipitado en 20 µL de agua destilada estéril y se incubó a 50°C durante 10 minutos.
- 8- Se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 30 segundos, se tomó el sobrenadante sin arrastrar restos de resina y se depositó en un tubo eppendorf nuevo.

3.2.8. Ligación en vectores de clonación de fragmentos de ADN

3.2.8.1. Ligación en vectores de clonación

La ligación entre el vector de clonación y un fragmento de ADN se realizó empleando una relación molecular 1:3 de vector : inserto. En un tubo eppendorf se adicionaron:

- x μL de vector
- y μL de inserto
- 1 μL de ligasa del fago T4 (Promega®)
- 1 μL de tampón de la ligasa (10x)
- Agua destilada estéril, completar hasta los 10 μL

Se mezcló todo suavemente y se centrifugó brevemente (aproximadamente 5 segundos) para recoger el contenido en el fondo del tubo. Para los extremos cohesivos la incubación fue a 12°C durante toda la noche. Para los extremos romos se incubó a temperatura ambiente durante un mínimo de 4 horas.

3.2.8.2. Generación de extremos romos a partir de extremos cohesivos

- 1- En un tubo eppendorf se adicionaron:
 - 10 μL de ADN digerido
 - 3 μL de tampón de incubación bajo en sales (tampón L, Roche®)
 - 4 μL de mezcla de dNTPs (0,125 mM de cada desoxirribonucleótido, Promega®)
 - 10,5 μL de agua destilada estéril

- 2,5 μL de mezcla de enzima: 0,5 μL de enzima de Klenow (Roche®) en 2 μL de tampón de Klenow
 - 2- Se mezcló y se dejó a temperatura ambiente de 10 a 15 minutos. La enzima se inactivó dejándola 10 minutos en un baño a 70°C.
 - 3- El ADN se purificó según el apartado 3.2.5.
-

- Tampón de Klenow (extemporánea): Tris HCl pH 8, 20 mM; MgCl₂, 100 mM.

3.2.8.3. Defosforilación de ADN lineal

La defosforilación de ADN lineal consiste en eliminar los grupos fosfato que se encuentran en el extremo 5', para evitar que el ADN vector se recircularice al hacer ligaciones.

a) Para extremos cohesivos:

En un tubo eppendorf se adicionaron:

- x μL de vector digerido
- 1 μL de enzima fosfatasa alcalina CIAP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, Promega®)
- 10 μL de tampón CIAP 10x
- Agua destilada estéril c.s.p. 100 μL

Se mezcló suavemente y se incubó 30 minutos a 37°C. Se añadió 1 μL de EDTA 0,5 M y se incubó 10 minutos a 70°C (para detener la reacción e inactivar la enzima). Se realizó una extracción con fenol-cloroformo, se precipitó el ADN y se resuspendió en agua destilada estéril.

b) Para extremos romos:

Se incubó a 37°C durante 15 minutos y a 56°C durante otros 15 minutos. Se añadió una segunda alícuota de enzima CIAP y se repitieron las dos incubaciones anteriores. Se añadió 1 µL de EDTA 0,5 M, se incubó 10 minutos a 70°C y se continuó como se describe en el apartado a).

3.2.9. Transformación de células competentes de *Escherichia coli*

3.2.9.1. Preparación de células competentes de *Escherichia coli* con RbCl

Las células competentes de *Escherichia coli* se prepararon con RbCl según la técnica descrita por Hanahan (1983), de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 1- Se inoculó un frasco de 10 mL de medio LB con la cepa DH5α de *Escherichia coli* y se incubó toda la noche a 37°C con agitación (150 r.p.m.).
- 2- Al día siguiente, se subcultivaron 500 µL del cultivo anterior a un matraz con 50 mL de medio LB suplementado con MgSO₄ 10 mM y se incubó a 37°C con agitación (150 r.p.m.) hasta que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0,4-0,6 (fase logarítmica).
- 3- El cultivo se depositó en un tubo de centrifuga estéril y se mantuvo en hielo durante 10-15 minutos.
- 4- Se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 3000 r.p.m., se eliminó el sobrenadante y se resuspendió suavemente el sedimento en 16 mL de solución RF1 estéril preenfriada a 4°C. Se mantuvo en hielo durante 15 minutos.
- 5- Se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 3000 r.p.m., se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 4 mL de solución RF2 estéril preenfriada a 4°C. Se mantuvo en hielo durante 15 minutos.

- 6- Se repartieron los 4 mL en alícuotas de 200 μ L en tubos eppendorf estériles.
- 7- Las células competentes se congelaron inmediatamente a -70°C .

- Solución RF1: RbCl, 2,40 g; MnCl₂, 1,98 g; acetato potásico, 0,59 g; CaCl₂, 0,30 g; glicerol, 35,63 g; agua destilada, c.s.p. 200 mL. Ajustar el pH a 5,3 con una solución de ácido acético 0,2 M.

- Solución RF2: MOPS (ácido morfolino propanosulfónico) 0,5 M, 2 mL; RbCl, 0,12 g; CaCl₂, 1,10 g; glicerol, 11,9 g; agua destilada, c.s.p. 100 mL. Ajustar el pH a 6,8 con una solución diluida de NaOH.

Ambas soluciones se esterilizan por filtración y se almacenan a 4°C .

3.2.9.2. Transformación de células competentes de *Escherichia coli*

La transformación de las células competentes de *Escherichia coli* con ADN plasmídico se llevó a cabo según el siguiente protocolo (Sambrook y Russell, 2001):

- 1- Se descongelaron las alícuotas de células competentes (conservadas a -80°C) poniéndolas en un baño de hielo durante un cuarto de hora.
- 2- Se mezclaron de 100 a 250 μ L de células competentes con 10 μ L de ADN plasmídico en un tubo eppendorf estéril y la mezcla se mantuvo en el baño de hielo durante 30 minutos.
- 3- Se calentó a 42°C durante 2 minutos (*heat-shock* o choque térmico) y a continuación se dejó otros 10 minutos en el baño de hielo.
- 4- Se añadió medio LB hasta llegar a 1 mL y se depositó en un tubo de ensayo estéril. Se incubó con agitación (150 r.p.m.) a 37°C durante una hora.
- 5- El cultivo se centrifugó a 6000 r.p.m. durante 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 100 μ L de medio LB y se

extendió en una placa de medio selectivo adecuado. La placa se incubó a 37°C durante toda la noche.

- En todos los experimentos se incluyeron controles negativos (células competentes sin añadir ADN). Asimismo se incluyeron controles positivos (células competentes con una cantidad conocida de un ADN estándar) cuando fue preciso estimar la competencia.
- Para realizar una selección por color blanco/azul (α -complementación) se deben preparar placas de los medios correspondientes suplementados con IPTG (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y X-Gal (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El compuesto IPTG se disuelve en agua bidestilada y se esteriliza por filtración, y el compuesto X-Gal se disuelve en dimetilformamida.

3.2.10. Mutagénesis al azar de *Rhizobium* con el transposón Tn5

Para realizar la mutagénesis al azar con Tn5 se empleó la cepa S17.1 portadora del plásmido pSUP2021. Este plásmido es un vector suicida y no puede replicarse en *Rhizobium*; lleva el gen de resistencia a la ampicilina y la inserción Tn5 (Km^r) que sólo puede saltar al azar a un punto del genoma de la cepa receptora (*Rhizobium*). La cepa S17.1 contiene los genes necesarios para la conjugación y es resistente a estreptomicina (hasta 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para llevar a cabo la mutagénesis al azar se siguió el siguiente protocolo (E. J. Bedmar, comunicación personal):

- 1- Se cultivó la cepa de *Rhizobium* durante 48 horas en 20 mL de medio TY líquido a 28°C con agitación (150 r.p.m.).
- 2- Se cultivó la cepa S17.1 pSUP2021 durante 24 horas en 10 mL de medio LB Km 25 a 37°C con agitación (150 r.p.m.).
- 3- Ambos cultivos se centrifugaron durante 30 minutos a 3000 r.p.m. y se resuspendieron las células en 5 mL de solución salina estéril (NaCl 0,9%).

- 4- Los cultivos se lavaron dos veces con solución salina estéril para eliminar los restos de medio de cultivo y de antibióticos.
- 5- Se midió la DO₆₀₀ final de las suspensiones de ambos cultivos lavados y se ajustaron ambas suspensiones a un valor similar de DO, diluyendo con solución salina estéril cuando fue necesario.
- 6- Se mezclaron las dos suspensiones en una proporción 6:1 de *Rhizobium* : *E. coli*, en un volumen final inferior a 500 µL.
- 7- Dicha mezcla se depositó sobre un filtro de nitrocelulosa Millipore® estéril (de 0,45 µm de tamaño de poro) dispuesto en el centro de una placa Petri de medio TY y se incubó a 28°C durante toda la noche.
- 8- El filtro se recogió en un vial que contenía 2 mL de glicerol al 20% estéril y se lavaron las células de la superficie del filtro. Estas suspensiones en glicerol se pueden conservar a -20°C.
- 9- La suspensión en glicerol se diluyó 1/10 y se extendieron de 30 a 50 µL en una placa de medio mínimo Y adicionado de kanamicina a 200 µg/mL. Así se evitó el crecimiento de *E. coli* (que es incapaz de desarrollarse en medio mínimo) y seleccionamos únicamente aquellas células de *Rhizobium* que contenían la inserción de Tn5 que le proporcionaba la resistencia a kanamicina.
- 10- Por último, se realizaron los tests que fueron necesarios para encontrar las mutantes en el gen deseado.

3.2.11. Screening para la detección de la producción de bacteriocinas en *Rhizobium*

La detección de la producción de bacteriocina se realiza fácilmente en medio sólido mediante la técnica denominada antagonismo diferido (Rodelas et al., 1998):

- 1- Se cultivaron las bacterias productoras en medio sólido o líquido.
- 2- Las bacterias productoras se sembraron en medio TY solidificado con un 2% de agar (para observar los halos de inhibición de la bacteriocina con mayor claridad ya que restringe la difusión de ésta en el medio) preparado en placas Petri de vidrio. La siembra se hizo en picadura empleando palillos de dientes estériles y usando como referencia una plantilla numerada. Se pueden acomodar hasta un máximo de 32 colonias por placa si se desea visualizar los halos sin que éstos se solapen.
- 3- Las placas se incubaron durante dos o tres días a 28°C.
- 4- Las colonias se inactivaron mediante exposición a vapores de cloroformo durante dos horas en una campana de evaporación. Para esto se colocaron las placas en posición invertida y se depositaron 2 mL de cloroformo en cada tapadera.
- 5- Para el revelado fue necesario un cultivo de 24 horas en medio líquido TY de la cepa indicadora M17 seleccionada en estudios anteriores (Rodelas et al., 1998) incubada a 28°C con agitación (150 r.p.m.). Con 0,1 mL de este cultivo se inocularon tubos de 4 mL de medio TY semisólido (agar al 0,6%) previamente fundidos y mantenidos en un baño de agua a 45-50°C. Se agitaron en el vórtex y se vertieron rápidamente sobre la superficie de las placas previamente inactivadas. El inóculo de la cepa indicadora se estandarizó ajustando la turbidez al 0,5 de la escala de McFarland.
- 6- Las placas reveladas se incubaron durante dos días a 28°C y se hizo la lectura de la medida de los halos en torno a las colonias (distancia en mm desde el borde de la colonia productora al límite del halo de inhibición).

3.2.12. Hibridación ADN-ADN

3.2.12.1. Transferencia de ADN a membranas de nylon (*Southern blot*)

Se realizó según la técnica de Southern (1975) de acuerdo con el siguiente protocolo (Sambrook et al., 1989):

- 1- En primer lugar se realizó una electroforesis de las muestras totalmente digeridas con las enzimas de restricción adecuadas, en un gel de agarosa del 0,7%. Se deben incluir controles positivos y negativos aparte de los marcadores.
- 2- Se llevó a cabo la tinción del gel en una solución de bromuro de etidio en TBE y se hizo una fotografía del mismo con una regla como referencia.
- 3- Se sumergió el gel en la solución depurinante durante 15 minutos y se lavó con agua destilada.
- 4- Se sumergió el gel en la solución desnaturalizante durante 35 minutos y se lavó con agua destilada.
- 5- Se sumergió el gel en la solución neutralizante durante 30 minutos.
- 6- A continuación se montó la unidad de transferencia: para ello se colocó un cristal encima de una bandeja de plástico que contenía 500 mL de tampón SSC 20x y se cubrió con dos tiras de papel de filtro (previamente humedecidas en SSC 20x) de manera que sus extremos quedaran sumergidos en la bandeja. A continuación se puso el gel boca abajo y la membrana de nylon (previamente cortada con el mismo tamaño del gel y humedecida en SSC 20x). La membrana de nylon empleada fue la Hybond-N+ de Amersham Pharmacia Biotech®, la cual está cargada positivamente. Se colocó parafilm alrededor del gel y de la membrana sobre el papel de filtro humedecido y se cubrió con dos hojas de papel Whatman 3MM (previamente cortadas con el mismo tamaño del gel y

humedecidas en SSC 20x), un bloque de al menos 5 cm de servilletas de papel, otro cristal y un peso de 0,5-1 kg. Por último, se comprobó que el tampón transfería a través del gel y no por el papel de filtro que había alrededor y se dejó transferir toda la noche. En el caso de tratarse de un gel de megaplásmidos, se dejó 48 horas.

- 7- Se desmontó la unidad de transferencia: se retiró el peso, el cristal, las servilletas y los papeles, y se cogió la membrana por una esquina con unas pinzas limpias. La membrana se lavó en SSC 2x durante 5 minutos y se dejó secar sobre papel de filtro durante una hora a temperatura ambiente. Por último, se introdujo la membrana en un envoltorio de papel Whatman 3MM y se calentó en un horno a 120°C durante 30 minutos para fijar el ADN a la membrana.
-

- Solución depurinante: HCl 250 mM.
- Solución desnaturalizante: NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M.
- Solución neutralizante: Tampón Tris/HCl 1,0 M pH 8,0; NaCl 1,5 M.
- Tampón SSC 20x: Citrato sódico 0,3 M; NaCl 3 M.

3.2.12.2. Marcaje de sondas con digoxigenina

El marcaje de las sondas se realizó mediante el sistema no radiactivo comercializado por Roche® *DIG DNA Labeling and Detection Kit*. Se partió de 10 ng a 3 µg del ADN que queríamos emplear como sonda, el cual se desnaturalizó a 100°C durante 10 minutos y se enfrió rápidamente en hielo. Se adicionaron 2 µL del vial 5 del kit (mezcla de hexanucleótidos), 2 µL del vial 6 del kit (*dNTP-labeling mixture*) y 1 µL del vial 7 del kit (fragmento Klenow de la ADN polimerasa). Se incubó toda la noche a 37°C y se detuvo la reacción con 2 µL de EDTA 0,2 M pH 8,0. Se conservó a -20°C.

3.2.12.3. Hibridación ADN-ADN con sondas no radiactivas

La hibridación ADN-ADN con sondas no radiactivas se llevó a cabo según el siguiente protocolo:

- 1- Prehibridación: se precalentó el tubo de hibridación y un frasco con 20 mL de la solución de prehibridación en el horno de hibridación a la temperatura de hibridación (42°C cuando la sonda es homóloga o 37°C cuando la sonda es heteróloga). A continuación se introdujo la membrana de nylon en el tubo de hibridación junto con la solución de prehibridación y se dejó en el horno durante 4 horas a 42°C (37°C cuando la sonda es heteróloga).
- 2- Hibridación: se precalentaron 25 mL de la solución de hibridación en el horno a 42°C (37°C cuando la sonda es heteróloga). La sonda se desnaturalizó a 100°C durante 10 minutos, se enfrió rápidamente en hielo y se añadió a la solución de hibridación. Se retiró la solución de prehibridación del tubo y se adicionó inmediatamente la solución de hibridación con la sonda. Se mantuvo a 42°C durante toda la noche (37°C cuando la sonda es heteróloga).
- 3- Se retiró la solución de hibridación, se extrajo la membrana y se realizaron los siguientes lavados:
 - a. Para sondas homólogas (condiciones de alta astringencia):
 - 2 veces con SSC 2x + SDS 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente.
 - 2 veces con SSC 0,1x + SDS 0,1% durante 15 minutos a 68°C.
 - b. Para sondas heterólogas (condiciones de baja astringencia):
 - 2 veces con SSC 2x + SDS 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente.
 - 2 veces con SSC 1x + SDS 0,1% durante 15 minutos a 55°C.

- 4- Se diluyó la solución madre de bloqueo al 10% con tampón 1 para que quedara a la concentración de trabajo (solución de bloqueo al 1%).
- 5- Se lavó la membrana durante 2 minutos en tampón de lavado y se retiró el tampón.
- 6- Se lavó la membrana durante 30 minutos en 30 mL de la solución de bloqueo y se retiró la solución.
- 7- Se diluyeron 3 μ L del vial 8 del kit (anticuerpo anti-digoxigenina) en 30 mL de la solución de bloqueo, se añadió la membrana y se incubó 30 minutos. A continuación se retiró.
- 8- La membrana se lavó dos veces durante 15 minutos en tampón de lavado y se retiró.
- 9- Se lavó la membrana durante 2 minutos en 20 mL de tampón 3 y se retiró.
- 10- Se adicionaron 10 mL de solución de color (extemporánea) sobre la membrana y se incubó en la oscuridad.
- 11- Se comprobó el revelado cada 5 minutos y para detener la reacción se añadieron 50 mL de agua bidestilada. Se esperaron unas horas y a continuación se extrajo la membrana y se dejó secar sobre papel de filtro. La membrana se almacenó en una bolsa de plástico evitando el contacto directo con luz fuerte.

-
- Solución de prehibridación/hibridación: SSC 5x; N-lauril sarcosina 0,1%; SDS 0,02%; formamida desionizada 50%; reactivo de bloqueo 1%.
 - Solución madre de bloqueo al 10%: reactivo de bloqueo, 1,2 g; tampón 1, 12 mL.
 - Solución de bloqueo al 1%: Solución madre de bloqueo al 10%, 6 mL; tampón 1, 54 mL.
 - Tampón 1 (para el reactivo de bloqueo): Ácido maleico 0,1 M; NaCl 0,15 M; pH 7,5.
 - Tampón de lavado: Tampón 1; Tween 20 0,3%.
 - Tampón 3: Tris/HCl 0,1 M pH 9,5; NaCl 0,1 M; MgCl 50 mM.

- Solución de color (extemporánea): Tampón 3, 10 mL; vial 9 del kit [NBT/ BCIP (nitroazul de tetrazolio/ 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato), reactivo de color del kit], 200 µL.

El agua empleada para hacer los reactivos anteriores es agua bidestilada (calidad MilliQ).

3.2.13. Transferencia de ADN a cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* mediante conjugación triparental

La transferencia de ADN a cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* se realizó mediante conjugación triparental en medio sólido, y se empleó como cepa *helper* o movilizadora la cepa DH5α de *Escherichia coli* con el plásmido pRK2013. Este plásmido contiene los genes necesarios para la transferencia de plásmidos por conjugación. Para llevar a cabo la conjugación triparental se mezclaron en una placa de medio TY las cepas bacterianas receptora (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*), donadora (*Escherichia coli* DH5α con el plásmido a transferir) y movilizadora (*Escherichia coli* DH5α con pRK2013) en una proporción 2:1:1. Esta mezcla se incubó a 28°C durante toda la noche y al día siguiente se sembró en placas de medio TY suplementado con los antibióticos adecuados para la selección de las transconjugantes. Posteriormente se realizó un aislamiento de las transconjugantes en placas de TY con los mismos antibióticos.

3.2.14. Recombinación doble en *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

En este trabajo se han construido varias mutantes (Z25-*rzcC*⁻, Z25-ΔpORF3::Gm, Z25-*cinI*) mediante la inserción de un gen de resistencia a la gentamicina (fragmento *SmaI* de 0,86 kb de pUCGM) en el gen que se deseaba mutar. Como requisito previo era necesario insertar el gen de resistencia a la gentamicina en el fragmento de ADN diana previamente clonado en el plásmido pBluescript II KS (-). Posteriormente el fragmento con el gen de resistencia a la gentamicina insertado se subclonó en pK18*mobsacB* para

llevar a cabo una recombinación doble y conseguir así una bacteria mutante en el gen de interés. La recombinación doble se realizó de acuerdo con una metodología basada en el protocolo de Schäfer et al. (1994):

- 1- Se cultivaron durante 24 horas con agitación (150 r.p.m.) la cepa de *Rhizobium* que se pretende mutar en 50 mL de medio TY, la cepa DH5 α de *Escherichia coli* con el plásmido pRK2013 en 50 mL de medio LB, y la cepa DH5 α de *Escherichia coli* con el plásmido pK18*mobsacB* con el fragmento clonado en 50 mL de medio LB Km.
- 2- Los cultivos se centrifugaron a 2500 r.p.m. durante 30 minutos y se desecharon los sobrenadantes.
- 3- Los sedimentos se resuspendieron en 5 mL de solución salina estéril.
- 4- Las suspensiones se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 20 minutos y se desecharon los sobrenadantes.
- 5- El sedimento de la cepa de *Rhizobium* se resuspendió en 500 μ L de solución salina estéril y las suspensiones de los demás cultivos se ajustaron para que tuvieran una DO₅₅₀ similar en 1 mL de solución salina estéril.
- 6- Se mezclaron las bacterias en proporción 6:1:1, es decir, se mezclaron 240 μ L de *Rhizobium*, 40 μ L de *E. coli* con pRK2013 y 40 μ L de *E. coli* con pK18*mobsacB*.
- 7- Se pusieron 200 μ L de la mezcla anterior en un filtro de nitrocelulosa Millipore® estéril colocado en una placa de medio TY, y se incubó a 28°C durante toda la noche.
- 8- El crecimiento del filtro se recogió en 1 mL de glicerol estéril al 20%.
- 9- Se hicieron diluciones 1/10 y 1/100, y se extendieron 50 μ L de cada dilución en placas de medio Y Km 200.

- 10- Se inoculó un frasco de 10 mL de medio Y líquido con una colonia aislada de una de las placas anteriores y se incubó dos días con agitación (150 r.p.m.) a 28°C.
- 11- Se extendieron 50-100 µL de cultivo en placas de medio Y con sacarosa al 10%.
- 12- Se picaron las colonias por duplicado en placas de medio Y Gm 15 y medio Y Km 200 respectivamente. Las colonias que crecieron en Y Gm 15 pero no en Y Km 200 eran las cepas recombinantes esperadas, las cuales fueron comprobadas por hibridación (*Southern blot*) o bien por PCR cuando así fue posible.

Para construir la mutante Z25-ΔpORF3 se tuvo que seguir otra estrategia. En primer lugar se hizo una deleción *HindIII* del plásmido pMAGR35 para obtener el plásmido pMAGR36. Con esta deleción se eliminó la zona promotora del ORF3 y parte del gen de la integrasa. Posteriormente este fragmento de ADN se subclonó en el vector pK18*mobsacB* y se obtuvo el plásmido pMAGR38, con el que se realizó una recombinación doble tal y como se describe a continuación:

- 1- Se cultivaron durante 24 horas con agitación (150 r.p.m.) la cepa Z25-ΔpORF3::Gm en 50 mL de medio TY, la cepa DH5α de *Escherichia coli* con el plásmido pRK2013 en 50 mL de medio LB y la cepa DH5α de *Escherichia coli* con el plásmido pMAGR38 en 50 mL de medio LB Km.
- 2- Se repitieron los pasos 2-11 del protocolo anterior.
- 3- Se picaron las colonias por triplicado en placas de medio Y con sacarosa al 10%, Y Gm 15, e Y Km 200, respectivamente. Las colonias que crecieron en medio Y con sacarosa al 10%, pero no en Y Gm 15 ni en Y Km 200 eran las cepas recombinantes esperadas, las cuales fueron comprobadas por PCR.

3.2.15. Amplificación de ADN por PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

La amplificación de ADN por PCR se empleó con varias finalidades: para amplificar los genes *cinRI*, para comprobar mutantes, y para la construcción de varias fusiones transcripcionales de la cepa Z25 de *Rhizobium leguminosarum*.

Forman parte de la reacción de PCR los siguientes componentes:

- ADN molde 50-100 ng
- Oligonucleótidos 15-20 pmoles
- Taq ADN polimerasa 1U
- dNTPs..... 200 μ M cada uno
- MgCl₂..... 1,5 mM
- Tampón 10x 5 μ L
- Agua bidestilada estéril (calidad MilliQ)..... c.s.p. 50 μ L

Los oligonucleótidos empleados fueron sintetizados por Sigma Genosys®.

Como ADN molde se empleó ADN aislado o bien el producto de la lisis de suspensiones celulares, tal y como se describe en Pozo et al. (2002). Se lisó una colonia bacteriana tras añadir 20 μ L de solución de lisis [NaOH 0,05 M; SDS 0,25% (p/v)] y hervir la mezcla durante 15 minutos. Se añadieron 200 μ L de agua destilada estéril al lisado y se centrifugó a 10000 g durante 5 minutos. Se tomaron 4 μ L del sobrenadante para emplearlo como ADN molde.

Cuando se empleó como ADN molde el producto de una lisis celular, se añadió albúmina sérica bovina (BSA) (0,2 mg/mL) para contrarrestar el efecto de posibles inhibidores de la amplificación. En el caso de partir de ADN molde de baja concentración, se adicionó DMSO al 5% para potenciar la amplificación gracias a un aumento de la desnaturalización en las zonas ricas en G+C.

Se emplearon diferentes tipos de ADN-polimerasa en función del objetivo de la PCR: Pfu Turbo (Stratagene®), TripleMaster (Eppendorf®), AmpliTaq Gold (Applied Biosystems®) y BIOTAQ (Bioline®). La polimerasa Pfu Turbo permite la amplificación de fragmentos de ADN de gran tamaño a prueba de errores. Se caracteriza por llevar el MgCl₂ incorporado en el tampón y por crear productos de PCR con los extremos romos. Cuando se emplea para amplificar fragmentos de gran tamaño se debe aumentar la concentración de los dNTPs para evitar que se conviertan en un factor limitante de la reacción. La polimerasa Triple Master es una mezcla de polimerasas que persigue el mismo objetivo que la Pfu Turbo. La diferencia es que los productos de PCR de esta enzima tienen colas de adenina en los extremos y para clonarlos es recomendable emplear el vector pGEM®-T (Promega®). La polimerasa AmpliTaq Gold se caracteriza por ser *Hot Start*, es decir, para que sea activa necesita un primer ciclo de desnaturalización más prolongado de lo habitual (de 5-10' a 95°C).

El programa de PCR de manera general consta de varias etapas:

- Desnaturalización de 2-3' a 95°C (excepto AmpliTaq Gold)
- 30 ciclos de:
 - Desnaturalización de 1' a 95°C
 - *Annealing* de 1' (a diferente temperatura según los cebadores)
 - Extensión a 72°C (el tiempo depende de la longitud del fragmento a amplificar)

- Extensión de 10' a 72°C

Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo en el termociclador GeneAmp PCR System 2400 (PerkinElmer®). En el apartado de resultados se indican las condiciones optimizadas para cada proceso de amplificación.

3.2.16. Amplificación de ADN por PCR inversa

La amplificación de ADN por PCR inversa permite amplificar zonas de secuencia desconocida que estén adyacentes a una zona de secuencia conocida (Ochman et al., 1988). En este caso se ha empleado para la construcción del plásmido pMAGR40. La estrategia utilizada constó de los siguientes pasos:

- 1- Se construyó una sonda correspondiente al extremo de la región de secuencia conocida y se marcó con digoxigenina, como se describe en el apartado 3.2.12.2.
- 2- Se realizaron digestiones de ADN genómico con enzimas de restricción cuyas dianas específicas se encontraban en la región de secuencia conocida cerca de la zona correspondiente a la sonda. Los fragmentos de restricción se separaron mediante electroforesis y se llevó a cabo una hibridación con la sonda marcada. Se seleccionó aquella enzima que dio lugar a fragmentos de un tamaño adecuado para su posterior amplificación y clonación.
- 3- Se hicieron una serie de diluciones de la digestión del ADN genómico con la enzima de restricción seleccionada (1, 1/20, 1/40, 1/80), y se llevaron a cabo ligaciones con 1 µL de cada una de las diluciones en un volumen total de 10 µL. Así se obtuvieron moléculas circulares de ADN por ligación intramolecular o religación.

- 4- Se dializaron las moléculas circulares de ADN durante 15 minutos en agua bidestilada estéril con filtros de nitrocelulosa de tamaño de poro 0,025µm y 13 mm de diámetro (Millipore®).
- 5- Se realizó una reacción de PCR en la que el ADN molde era el producto de las ligaciones. Los cebadores empleados (PRI1 y PRI2, Tabla 3.4), cuya longitud fue de 28 pares de bases, se diseñaron a partir de la región de secuencia conocida en sentido divergente, es decir, orientados hacia el exterior de ésta. Así se consiguió un fragmento lineal que contenía parte de la secuencia conocida en los extremos y la zona adyacente de secuencia desconocida en el centro. Los parámetros de la reacción de PCR y los componentes de dicha reacción se muestran a continuación:

Programa de PCR:

- 95°C 2'
- 30x 95°C 1'
- 68°C 1'
- 72°C 10'
- 72°C 10'

Componentes (µL):

- ADN (ligaciones)10
- Tampón 10x5
- PRI1.....0,2
- PRI2.....0,2
- dNTPs.....2
- Pfu Turbo1
- Agua*31,6

- 6- Tras comprobar el tamaño del producto de la anterior PCR por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, se llevó a cabo una segunda PCR (PCR anidada) en la que el ADN molde era el producto de la primera PCR. La estrategia de PCR anidada tiene como fin la amplificación de una cantidad de ADN que garantice el éxito en la posterior clonación. Los cebadores de la segunda PCR (Tabla 3.4) se diseñaron a partir de la región de secuencia conocida en sentido divergente a continuación de los cebadores de la primera PCR. Los parámetros de la reacción de PCR y los componentes de dicha reacción se muestran a continuación:

Programa de PCR:

- 95°C 2'
- 30x 95°C 30''
- 56°C 1'
- 72°C 5'
- 72°C 10'

Componentes (µL):

- ADN (1ª PCR 1/20) 4
- *Tuning buffer* 5
- dNTPs 2
- PRI3 0,2
- PRI4 0,2
- Triple Master 0,5
- Agua* 38,1

Tabla 3.4: Oligonucleótidos empleados en la PCR inversa.

Oligonucleótido	Secuencia
PRI1	CCACGGCTGTAATAATAGGAGTCGCTCC
PRI2	CTCGACACTGCGCTCAGGAGTCTTGTGG
PRI3	GTTCATGTCCCAGACACC
PRI4	GACCGTTACAACAGCGGT

- 7- Se realizó una electroforesis de la segunda PCR en gel de agarosa, y después de la tinción con bromuro de etidio se escindió la banda de interés y se procedió a la extracción del ADN.
- 8- El fragmento de ADN extraído se clonó en el vector pGEM®-T (Promega®), que se caracteriza por poseer un nucleótido de timina en el extremo 3'.

- *: El agua empleada en la PCR es agua bidestilada estéril (calidad MilliQ).

3.2.17. Secuenciación de ADN

El ADN plasmídico para secuenciación se obtuvo con el kit Concert *Rapid Plasmid Miniprep System* (Gibco BRL®). La secuenciación de ADN fue llevada a cabo por D. Antonio Lario, en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (CSIC, Granada). Se obtuvieron las secuencias a partir de ADN de doble cadena, en un secuenciador automático Applied Biosystems® ABI 373 y utilizando el kit ABI PRISM *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems®). En las reacciones se emplearon 50-100 ng de ADN molde y 5 pmol de cebador. Las muestras se amplificaron en un termociclador PerkinElmer 9600 (Applied Biosystems®) y posteriormente se filtraron por una columna de Sephadex G-50 para retirar el exceso de terminadores no incorporados. Las secuencias obtenidas se visualizaron con el programa de distribución gratuita *Chromas* v. 1.45.

Los oligonucleótidos empleados fueron cebadores universales y cebadores internos de diseño, los cuales fueron sintetizados por Sigma Genosys® y permitieron completar la lectura de la secuencia.

3.2.18. Tratamiento y análisis de las secuencias

El tratamiento y análisis de las secuencias de ADN y de proteínas se llevó a cabo con el programa Gene Runner v. 3.05, con el paquete de programas gratuitos EMBOSS (*European Molecular Biology Open Software Suite*) v. 2.3.1. (Rice et al., 2000) disponible en Internet, y con los programas EditSeq v. 3.97 y MapDraw v. 3.12 del paquete de programas DNASTar. El diseño de los cebadores se realizó con la ayuda del programa Gene Runner v. 3.05. La búsqueda de marcos abiertos de lectura se hizo con el programa GeneMark (Borodovsky y McIninch, 1993) disponible en el servidor de

Internet del EBI (*European Bioinformatics Institute*). Para la predicción de regiones promotoras así como el posible sitio de inicio de la transcripción, se empleó el programa BDGP *Neural Network Promoter Prediction* (Reese, 2001).

La comparación de las secuencias con las registradas en las bases de datos se llevó a cabo con los programas BLAST 2.2.10 [Oct-19-2004] (Altschul et al., 1997) a través del servidor de Internet del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Los alineamientos de las proteínas se hicieron con el programa CLUSTALX v. 1.83 (Jeanmougin et al., 1998) y los gráficos resultantes se realizaron con el editor de alineamientos GeneDoc v. 2.6.002 (Nicholas et al., 1997). La búsqueda de dominios conservados en las proteínas se realizó con el programa RPS-BLAST 2.2.10 [Oct-19-2004] (*Reverse Position Specific BLAST*) a través del servidor de Internet del NCBI. La base de datos de dominios conservados se denomina CDD (*Conserved Domain Database*; Marchler-Bauer et al., 2003).

El programa SOSUI (v. 1.0/10, Mar., 1996) (Mitaku et al., 2002; Mitaku e Hirokawa, 1999; Hirokawa et al., 1998) se empleó para distinguir entre proteínas solubles y proteínas de membrana a partir de la secuencia de aminoácidos con una precisión mayor de un 99%, y para predecir hélices transmembrana con una precisión de aproximadamente un 97%. Las hélices transmembrana predichas se clasifican en primarias y secundarias. Las primarias son principalmente hidrofóbicas y las secundarias son anfífilas. Con el programa SOSUI (Signal) (versión beta) y el servidor SignalP 3.0 (Bendtsen et al., 2004) fue posible localizar péptidos señales en la secuencia aminoacídica de las proteínas procariotas. Asimismo con los programas PSORT v. 6.4 (Nakai y Kanehisa, 1991) y PSORTb v. 2.0.4 (Gardy et al., 2005) se llevó a cabo una predicción de la posible localización de las proteínas. Por otra parte, se hizo un estudio predictivo de la estructura secundaria consenso de las proteínas (Deleage et al., 1997), de la presencia de estructuras *coiled-coil* (2 hélices α yuxtapuestas) (Lupas et al., 1991)

y de motivos hélice-vuelta-hélice (HTH) (Dodd y Egan, 1990) mediante el servidor NPS@ (*Network Protein Sequence Analysis*) del PBIL (*Pôle BioInformatique Lyonnais*). También se buscaron cremalleras de leucinas (estructura *coiled-coil* en la que las dos hélices interactúan entre sí mediante cadenas laterales de leucinas) con el servidor 2ZIP (Bornberg-Bauer et al., 1998), y repeticiones con el programa Radar (*Rapid Automatic Detection and Alignment of Repeats*) (Heger y Holm, 2000) disponible en el servidor del EBI. En el caso de la proteína codificada por el ORF5 la búsqueda de motivos repetidos se realizó con el programa fuzzpro de EMBOSS. No se empleó el programa Radar ya que el tamaño de la proteína en la que busca repeticiones está limitado a 1000 aminoácidos y el ORF5 posee más de 4000 aminoácidos.

Las direcciones *web* de los programas mencionados anteriormente se pueden encontrar en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5: Direcciones *web* de los diferentes programas empleados.

Servidor	Programa	Dirección web
2ZIP	2ZIP	http://2zip.molgen.mpg.de/
BDGP <i>Neural Network Promoter Prediction</i>		http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html
EBI	GeneMark Radar	http://www.ebi.ac.uk/genemark/ http://www.ebi.ac.uk/Radar/
EMBOSS	fuzzpro	http://bioinfo.hku.hk/EMBOSS/
NCBI	BLAST RPS-BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
NPS@	Coiled-coil HTH Predicción de estructura secundaria consenso	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html
PSORT	PSORT PSORTb	http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/
SignalP	SignalP	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
SOSUI	SOSUI SOSUI(Signal)	http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0E.html

3.2.19. Determinación del sitio de inicio de la transcripción mediante la reacción de extensión del cebador (*primer extension*)

3.2.19.1. Extracción del ARN total

Se inoculó un frasco de 10 mL de medio TY Sm con la cepa Z25 a partir de un cultivo en una placa del mismo medio, y se incubó durante 24 horas a 28°C con agitación (150 r.p.m.). Posteriormente las células se recogieron por centrifugación y se extrajo el ARN total con el kit comercial NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel®), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras se conservaron a -80°C y se comprobaron alícuotas de 5 µL mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en una cubeta de electroforesis libre de ARNasa, seguida de tinción con bromuro de etidio y visualización con luz ultravioleta. El tampón empleado en la electroforesis fue tampón TAE 1x tratado con dietilpicrocarbonato (DEPC, Sigma®), el cual también se utilizó para hacer el gel de agarosa al 1% y la solución de bromuro de etidio DEPC.

La totalidad del agua destilada empleada en el aislamiento de ARN fue tratada con DEPC (2 µL/mL) durante toda la noche y posteriormente autoclavada dos veces. El tampón TAE 1x DEPC se obtuvo por dilución del tampón TAE 50x DEPC con agua destilada DEPC. El tampón TAE 50x DEPC se obtuvo tratando el tampón TAE 50x con DEPC (2 µL/mL) durante toda la noche y autoclavando dos veces.

-
- TAE 50x: Tris, 242 g; ácido acético, 57,1 mL; EDTA 0,5 M, 100 mL; agua destilada, c.s.p. 1 litro. Ajustar el pH a 8,5.
 - Solución de bromuro de etidio DEPC: bromuro de etidio 2 µg/mL, TAE 1x DEPC.

3.2.19.2. Diseño y marcaje del cebador

En primer lugar se diseñó un cebador complementario al ARN mensajero en una zona próxima al inicio de traducción del gen de interés y en dirección a la posible región promotora. Para marcar el oligonucleótido por fosforilación del extremo 5' con [γ - 32 P] ATP se siguió el siguiente protocolo:

- 1- En un tubo eppendorf libre de ARNasa se adicionaron:
 - 2 μ L de oligonucleótido (20 pmoles totales)
 - 5 μ L de *Forward Reaction Buffer* 5x
 - 1 μ L de polinucleótido quinasa T4 (10U/ μ L) (Invitrogen®)
 - 2,5 μ L de [γ - 32 P] ATP (50 μ Ci totales)
 - 9,5 μ L de agua destilada DEPC
- 2- Se incubó a 37 °C durante 1 hora.
- 3- La enzima se inactivó por calentamiento a 65-70 °C durante 10 minutos.
- 4- Se introdujo la mezcla en hielo y a continuación se centrifugó brevemente.
- 5- La mezcla se filtró a través de una columna de Sephadex G-25 mediante centrifugación a 3000 r.p.m. durante 3 minutos. De esta manera se eliminó el ATP γ - 32 P no incorporado.
- 6- El marcaje se comprobó mediante cuantificación en un contador de centelleo. El valor fue superior a 10^5 cpm/ μ L.

Se emplearon los oligonucleótidos PEC (5'-CACTTCCGTCGCAATGTTA-3') y PEA (5'-CATGCGAACGAGCGTATA-3'), ambos sintetizados por Sigma-Genosys®.

3.2.19.3. Hibridación y extensión reversa a partir del cebador

Hibridación ARN-cebador

La hibridación ARN-cebador se realizó según el siguiente protocolo:

- 1- En un tubo eppendorf libre de ARNasa se mezclaron 7,5 μL de ARN total (hasta un máximo de 10 μg), 0,5 μL de oligonucleótido marcado y 2 μL de agua destilada DEPC, y se centrifugó brevemente.
- 2- Se incubó la mezcla a 95 °C durante 5 minutos.
- 3- Se incubó la mezcla a 65 °C durante 10 minutos.
- 4- Se dejó enfriar lentamente hasta llegar a los 42 °C.

Reacción de extensión

La reacción de extensión se llevó a cabo según el siguiente protocolo:

- 1- A la mezcla anterior se le añadieron:
 - 10 μL de tampón 5x
 - 1 μL de mezcla de dNTPs (10 mM de cada dNTP)
 - 2 μL de DTT
 - 1 μL de SuperScript II RNase H⁻ transcriptasa reversa (200U/ μL) (Invitrogen®)
 - 26 μL de agua destilada DEPC
- 2- Se centrifugó brevemente y se incubó a 42 °C durante 1 hora.

- 3- La reacción se detuvo añadiendo 5 μL de acetato sódico 3M pH 5,3 y 150 μL de etanol absoluto, y se dejó toda la noche precipitando a -20°C .
- 4- Se centrifugó 15 minutos a 13000 r.p.m. y se eliminó el sobrenadante.
- 5- El precipitado se lavó con 150 μL de etanol al 70%.
- 6- Se centrifugó 15 minutos a 13000 r.p.m., se eliminó el sobrenadante y se dejó secar.
- 7- El precipitado se resuspendió en 5 μL de agua bidestilada estéril y se congeló a -20°C .

3.2.19.4. Reacción de secuenciación

El ADN plasmídico (pMAGR8) se secuenció empleando el kit comercial T7 *Sequencing Kit* (USB®), siguiendo las recomendaciones del fabricante y utilizando los oligonucleótidos anteriormente marcados con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (Apartado 3.2.19.2). A continuación se llevó a cabo una electroforesis de las muestras correspondientes a la reacción de secuenciación y del ADNc obtenido en la reacción de extensión en un gel desnaturante de poliacrilamida al 6,5% (p/v) en TBE a 1500 V. Posteriormente el gel se transfirió a un papel de filtro Whatman 3MM y se secó en un sistema de vacío a 65°C durante aproximadamente dos horas. El gel se autorradiografió en una película Curix RP2 (Agfa®) durante un mínimo de 24 horas a -80°C . Para el revelado de la película se emplearon el revelador y el fijador Agfa®, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

- Poliacrilamida desnaturante (urea 7M) al 6,5% (p/v): Solución de acrilamida/bis-acrilamida (37,5:1) al 40% (Sigma®), 9,76 mL; urea, 25,2 g; TBE 10x, 6 mL; agua destilada, c.s.p. 60 mL. Inmediatamente antes de verter el gel se añadieron los agentes polimerizantes: 250 μL de persulfato amónico al 10% (p/v) y 75 μL de TEMED.

3.3. ENSAYOS CON PLANTAS

3.3.1. Inoculación de plantas de guisante (*Pisum sativum* cv. Frisson) con cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

3.3.1.1. Desinfección y pregerminación de las semillas

La desinfección y pregerminación de las semillas se realizó según el siguiente protocolo (Rodelas et al., 1999):

- 1- Se sumergieron las semillas (aproximadamente unas treinta) en un matraz Erlenmeyer estéril de 250 mL con 20 mL de etanol al 70% durante 10 segundos. Se lavaron con agua destilada estéril y se decantó el agua.
- 2- Las semillas se trataron con 10 mL de lejía comercial (solución de hipoclorito sódico 1 M) durante 10 minutos.
- 3- Se lavaron seis veces con abundante agua destilada estéril.
- 4- Se añadieron 25 mL de agua destilada estéril y se dejó toda la noche a 22°C en un agitador orbital a 50 r.p.m.
- 5- Se pusieron de cinco a seis semillas en cada placa de agar-agua (1,5% de agar).
- 6- Se dejaron las placas tapadas en la cámara de cultivo durante dos o tres días para que germinaran. También se pueden dejar a temperatura ambiente durante tres días al resguardo de la luz.

3.3.1.2. Solución nutritiva para el cultivo de las plantas

Se ha empleado la solución nutritiva de Fahræus descrita por Vincent (1970):

Solución nutritiva de Fahræus 10x: $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1,2 g; KH_2PO_4 , 1 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 1 g; citrato férrico, 0,05 g (*); solución de Gibson, 10 mL (**); agua destilada, 1 litro.

(*) Se preparó una solución de citrato férrico de 1 g/200 mL de agua destilada y se añadieron 10 mL a la solución de Fahræus 10x.

(**) Solución de Gibson (oligoelementos): H_3BO_3 , 2,68 g; $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 2,03 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 220 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 80 mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 80 mg; agua destilada, 1 litro.

El pH de la solución de Fahræus 1x se ajustó a 6,5-7. A continuación se esterilizó en autoclave a 115°C durante 30 minutos. Si es necesario este medio se puede solidificar con agar al 1% (p/v).

3.3.1.3. Siembra de las plántulas, inoculación y crecimiento

Cada una de las semillas germinadas se introdujo en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 200 mL de medio F (solución de Fahræus 1x solidificada con agar al 1%). Estos matraces se cubrieron con bolsas negras para que las raíces de las plántulas quedaran resguardadas de la luz. Se dejaron a temperatura ambiente durante una semana y cuando los tallos alcanzaron el borde de los matraces estos se extrajeron con cuidado de no romperlos. Se descartaron las plántulas que resultaron dañadas durante la manipulación y las que ofrecían un desarrollo insuficiente.

Se inocularon frascos de 10 mL de TY con las bacterias a partir de cultivos en placa y se incubaron a 28°C con agitación (150 r.p.m.) durante toda la noche. A continuación se subcultivaron 500 µL de estos cultivos a frascos de 10 mL de TY. Al día siguiente los cultivos se centrifugaron 30 minutos a 2500 r.p.m., se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 10 mL de solución salina estéril. Se volvió a repetir esta operación y se midió la DO₅₅₀ de cada una de las suspensiones. En el ensayo de nodulación se ajustó la DO₅₅₀ a 0,75 con solución salina estéril. Se adicionó 1 mL de cada una de estas suspensiones a frascos con 9 mL de solución salina estéril, de manera que obteníamos una dilución 1:10. Las plantas se inocularon con 1 mL de estas suspensiones celulares, lo que correspondía a una proporción de 10⁹ células/semilla. En el caso del ensayo de competición se ajustó la DO₅₅₀ a 0,55 con solución salina estéril y el inóculo consistió en una mezcla de dos cepas. Para ello, se adicionó 1 mL de cada una de las dos suspensiones en cuestión a frascos con 8 mL de solución salina estéril. Las plantas se inocularon con 1 mL de esta mezcla, lo que correspondía a una proporción de 10⁸ células/semilla. A continuación se depositaron las plantas en una cámara de cultivo (Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada) bajo las siguientes condiciones ambientales:

- Fotoperíodo: 16 h luz/ 8 h oscuridad.
- Temperatura: 25°C día/ 20°C noche.
- Humedad relativa: 55%-75%.
- Densidad de flujo fotónico fotosintético (400-700 nm) de 450 µmol m⁻² s⁻¹, proporcionada por una combinación de lámparas fluorescentes e incandescentes.

3.3.2. Ensayo de nodulación

Cada dos días se determinó el número de nódulos que aparecieron en la raíz de las plantas desde los 4 hasta los 21 días a partir de la inoculación con las bacterias. En este momento se extrajeron las plantas de los matraces y se determinó la actividad nitrogenasa mediante ensayo de ARA (Apartado 3.4.2). Posteriormente se aislaron la totalidad de los nódulos de cada planta y se desecaron, junto con la raíz y la parte aérea de cada planta, en un horno a 70°C. A las 72 horas se registró por separado el peso seco de cada fracción.

3.3.3. Ensayo de competición por la nodulación

La esterilización de los nódulos se hizo de acuerdo con un protocolo anteriormente descrito (Rodelas, 1995). En primer lugar se obtuvieron los nódulos de cada una de las plantas dos semanas después de la inoculación y se depositaron en un tubo eppendorf. Para esterilizarlos se trataron con 1 mL de HgCl₂ al 0,25% durante 4 minutos. A continuación se hicieron cinco lavados con agua destilada estéril.

Con unas pinzas flameadas con alcohol se colocaron los nódulos de uno en uno en los pocillos de una placa de microtitulación estéril, en los que anteriormente se habían adicionado 75 µL de medio TY estéril. Los nódulos se aplastaron individualmente empleando varillas estériles de punta plana. A continuación se tomó de cada uno de los pocillos una gota de medio TY con restos de nódulo y se depositó en placas con los antibióticos correspondientes (TY Sm y TY Sp). Estas placas se incubaron a 28°C durante cuatro días. Por último, se calculó el porcentaje de nódulos en los que se produjo infección por cada una de las cepas que competían entre sí.

3.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.4.1. Determinación de la actividad β -galactosidasa

La actividad β -galactosidasa se determinó siguiendo una metodología basada en protocolo anteriormente descrito (Miller, 1972). La enzima β -galactosidasa es una enzima que hidroliza β -D-galactósidos. Se puede medir fácilmente mediante el uso de sustratos cromogénicos, sustratos incoloros que al hidrolizarse dan productos coloreados. Un ejemplo es el *orto*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido u ONPG, que en presencia de la β -galactosidasa da lugar a galactosa y *orto*-nitrofenol. Este último compuesto es amarillo y se puede medir su absorción a 420 nm. Si la concentración de ONPG es bastante alta, la cantidad de *orto*-nitrofenol producida es proporcional a la cantidad de enzima presente y al tiempo durante el cual la enzima reacciona con el reactivo ONPG. La reacción se para al añadir una solución de Na_2CO_3 concentrado, que cambia el pH a 11. La enzima β -galactosidasa no es activa a este pH.

El cálculo de las unidades de actividad β -galactosidasa se lleva a cabo con la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades} = \frac{A_{420}}{DO_{600} \cdot t(\text{min}) \cdot \text{dilución}} \cdot 2000$$

3.4.1.1. Actividad β -galactosidasa en *Rhizobium leguminosarum*

En primer lugar se inocularon frascos de 10 mL de medio TY Tc con las diferentes cepas bacterianas y se incubaron a 28°C con agitación (150 r.p.m.). Al día siguiente se subcultivaron 250 μ L de cada cultivo a frascos de 10 mL de medio TY Tc, y un día más tarde se subcultivaron 250 μ L de estos últimos cultivos a matraces Erlenmeyer de 250 mL con 25 mL de medio TY Tc. Una vez llegado el momento del ensayo, se siguió la siguiente metodología:

- 1- Se tomó 1 mL de cultivo y se midió la DO₆₀₀.
- 2- Se adicionó 1,5 mL de cultivo a un tubo eppendorf de 2 mL.
- 3- Se centrifugó a 13000 r.p.m. y se retiró el sobrenadante.
- 4- El sedimento se resuspendió en 500 μ L de tampón Z.
- 5- Se centrifugó a 13000 r.p.m. y se retiró el sobrenadante.
- 6- El sedimento se resuspendió en 2 mL de tampón Z.
- 7- Se tomó 1 mL de la suspensión y se midió la DO₆₀₀.
- 8- Se añadieron 2 gotas de cloroformo y 2 gotas de SDS al 0,1% al mililitro restante para lisar las células y se agitó en vórtex durante 20 segundos.
- 9- Se incubaron los tubos durante 10 minutos a 28°C.
- 10- Se puso en marcha el cronómetro y dentro del baño se adicionaron 200 μ L de ONPG (4 mg/mL) a cada tubo a intervalos constantes de 10-15 segundos.
- 11- A los 5 minutos se detuvo la reacción añadiendo 400 μ L de Na₂CO₃ 1,5 M a cada tubo a intervalos constantes de 10-15 segundos. Si el color apareció demasiado rápido y es demasiado intenso se diluyó la muestra original en tampón Z y se repitió desde el paso 8.
- 12- Se centrifugó a 13000 r.p.m.

13- El sobrenadante se depositó en una cubeta de espectrofotómetro y se midió la absorbancia a 420 nm.

14- Se calcularon las unidades de actividad β -galactosidasa.

- Tampón Z: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,06M; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,04M; KCl 0,01M; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,001M; β -mercaptoetanol 0,05M. No se debe autoclavar. Ajustar el pH a 7,0.

- ONPG (extemporánea): 4 mg/mL en tampón fosfato 0,1M, pH 7,0. Proteger de la luz.

3.4.1.2. Actividad β -galactosidasa en *Escherichia coli*

Para que el ensayo en *E. coli* fuera comparable con el ensayo en *Rhizobium* los cultivos se hicieron en medio TY Tc y se incubaron a 28°C con agitación (150 r.p.m.). La única diferencia en relación a los ensayos con *Rhizobium* es que se tomaron 750 μL de cultivo en lugar de 1,5 mL. En este sentido, la fórmula a aplicar sufrió los siguientes cambios:

$$\text{Unidades} = \frac{A_{420}}{DO_{600} \cdot t(\text{min}) \cdot \text{dilución}} \cdot 4000$$

3.4.2. Ensayo de actividad reductora de acetileno (ARA) de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* en nódulos de guisante

La actividad nitrogenasa de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* en nódulos de guisante se midió mediante el ensayo de reducción de acetileno (Rodelas, 1995) de acuerdo con la siguiente metodología:

- 1- Se depositaron las plantas de guisante en hielo.
- 2- Se cortaron fragmentos de raíz de unos tres centímetros de longitud que contuvieran nódulos y se introdujeron en tubos de ensayo de 12 mL conteniendo en el fondo un trozo de papel de filtro impregnado con 200 μL de solución de Fahræus (ver página 154).
- 3- Se cerró el tubo con un tapón de rosca perforado y sellado con un disco de silicona, y se sustituyó el 10% (v/v) de la atmósfera por acetileno (C_2H_2). El acetileno se preparó de manera extemporánea a partir de carburo cálcico y agua.
- 4- Los tubos se incubaron en un baño de agua a 28°C durante 10 minutos, manteniéndolos en la oscuridad.
- 5- Se determinó el contenido de etileno de 500 μL de la atmósfera interior de los tubos mediante cromatografía de gases.
- 6- Se midió el volumen exacto de cada tubo llenándolos con agua.
- 7- Los nódulos se desecaron en una estufa a 70°C durante tres días y se pesaron en una balanza de precisión.

Los resultados del ensayo se expresaron como nmoles de etileno/mg peso seco nódulos·h (ARA específica) y nmoles de etileno/planta·h (ARA por planta).

En los ensayos de ARA se empleó un cromatógrafo de gases PerkinElmer® 8420, equipado con un detector de ionización de llama de H_2 y una columna Teknokroma® (1m x $\frac{1}{4}$ de pulgada) empaquetada con Poropak®-T (80-100 mesh), conectado a un integrador computerizado PerkinElmer® LCI-100 para la cuantificación de las áreas bajo los picos. Como gas portador se utilizó N_2 a una presión de $0,7 \text{ kg/cm}^2$. Las temperaturas del horno, detector e inyector fueron respectivamente 80°C , 200°C y 200°C . La identificación de los picos y la cuantificación de la actividad enzimática se

efectuaron mediante rectas de calibrado calculadas a partir de diluciones con un patrón de C₂H₄ en aire, de concentración 135 nmol/mL.

3.5. AHLS

3.5.1. Ensayo en placa para la detección de AHLs

3.5.1.1. Ensayo en placa con *Chromobacterium violaceum* cepa CV026

Es conocido que la bacteria *Chromobacterium violaceum* controla la producción de un pigmento de color violeta denominado violaceína mediante mecanismo de *quorum sensing*. La cepa CV026 de *Chromobacterium violaceum* es una mutante incapaz de producir su propia AHL por lo que no produce el pigmento, pero que responde a determinadas moléculas señales exógenas (McClellan et al., 1997). Reconoce *N*-hexanoil-L-HSL como su señal propia y es muy sensible a las AHLs estándar de cadena corta y mediana (4-8 carbonos). Sin embargo, no es sensible a las AHLs de cadena larga (McClellan et al., 1997; Cha et al., 1998). El ensayo en placa con la cepa CV026 de *Chromobacterium violaceum* se realizó según la siguiente metodología:

- 1- Se inocularon 10 mL de medio medio TY con la cepa CV026 de *C. violaceum* y el cultivo se incubó a 28°C durante 24 horas con agitación (150 r.p.m.). Se sembraron placas de medio TY con los antibióticos necesarios con las cepas productoras de AHLs y se incubaron a 28°C durante 24 horas.
- 2- Al día siguiente, se subcultivaron 500 µL de cultivo de la cepa CV026 a un frasco con 10 mL de medio TY y se incubó a 28°C durante 24 horas con agitación (150 r.p.m.). Las cepas productoras de AHLs se resembraron en placas de medio TY sin antibiótico.

- 3- Se sembró con un escobillón estéril una placa de medio TY con la cepa CV026. A continuación se depositó con un palillo de dientes esteril una colonia de las cepas productoras de AHLs en la placa anterior y se incubó a 28°C durante 24 horas. Alrededor de las cepas productoras se visualizó un halo de color violeta.

3.5.1.2. Ensayo en placa con *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 pZLR4

El plásmido pZLR4 contiene el operón *traCDG* con su región promotora y el gen *traR* clonados independientemente a partir del plásmido pTiC58 en el vector de amplio rango de hospedador pBBR1MCS5 (Kovach et al., 1995). La actividad indicadora se debe a la fusión transcripcional del gen *traG* con el gen *lacZ* (*traG::lacZ*) (Cha et al., 1998). La construcción porta resistencia a ampicilina/carbenicilina y gentamicina. La cepa NTL4 pZLR4 detecta un amplio rango de AHLs y muestra una gran sensibilidad. No es particularmente sensible a las AHLs de cadena corta incluyendo a *N*-hexanoil-L-HSL, y no responde en ningún caso a *N*-butanoil-L-HSL y *N*-(3-hidroxi-butanoil)-L-HSL. Por lo tanto es adecuado usar *C. violaceum* como indicador complementario pues este sistema sí responde con una sensibilidad razonable a *N*-butanoil-L-HSL y *N*-hexanoil-L-HSL. Asimismo el indicador *tra* detecta compuestos con características cromatográficas diferentes a las de los estándar, los cuales podrían ser AHLs con cadenas laterales atípicas o bien compuestos con nuevas estructuras (Cha et al., 1998). El ensayo en placa con *A. tumefaciens* NTL4 pZLR4 se llevó a cabo según el siguiente protocolo:

- 1- Se inocularon 10 mL de medio AB con *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 pZLR4 y el cultivo se incubó a 28°C durante 24 horas con agitación (150 r.p.m.). Se sembraron placas de medio TY con los antibióticos necesarios con las cepas productoras de AHLs y se incubaron a 28°C durante 24 horas.
- 2- Al día siguiente, se subcultivaron 500 µL de cultivo de la cepa NTL4 pZLR4 a un frasco con 10 mL de medio AB y se incubó a 28°C durante 24 horas con

agitación (150 r.p.m.). Las cepas productoras de AHLs se resembraron en placas de medio TY sin antibiótico.

- 3- Se sembró con un escobillón estéril una placa de medio AB con X-Gal con la cepa NTL4 pZLR4. Con un palillo de dientes estéril se depositó una colonia de las cepas productoras de AHLs en la placa anterior y se incubó a 28°C durante 24 horas. Alrededor de las cepas productoras se visualizó un halo de color azul.

3.5.2. Extracción de AHLs

El protocolo de extracción de AHLs es una modificación de protocolos anteriormente descritos (Rodelas et al., 1999; Marketon y González, 2002), siguiendo en nuestro caso la metodología mostrada a continuación:

- 1- Se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 mL con 25 mL de medio TY con las bacterias, y los cultivos se incubaron a 28°C durante 24 horas con agitación (150 r.p.m.).
- 2- Los cultivos bacterianos se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante una hora.
- 3- El sobrenadante se adicionó a un tubo limpio. Cuando el sobrenadante estuvo turbio, se repitió la centrifugación.
- 4- Se añadió un volumen de diclorometano y se agitó. Cuando las fases se hubieron separado se tomó la fase de abajo (fase orgánica) y se depositó en un tubo limpio.
- 5- Se concentró por centrifugación al vacío durante 1 hora y 15 minutos.
- 6- Se resuspendió en 1 mL de metanol al 70% y se depositó en un tubo eppendorf.
- 7- Se concentró por centrifugación al vacío durante 50 minutos.
- 8- Se resuspendió en 50 µL de metanol al 70%.

3.5.3. Análisis de los extractos de AHLs por cromatografía en capa fina

Las acil homoserina lactonas se analizaron por cromatografía en capa fina empleando como organismo indicador *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 pZLR4 según el protocolo (Marketon y González, 2002) que se especifica en los siguientes apartados.

3.5.3.1. Cromatografía en capa fina

- 1- Se aplicaron de 2-4 μL de diluciones 1/3 de los extractos de AHLs de las cepas Z25 y Z25-*cinI* y 2 μL de una dilución 1/10 del extracto de AHLs de la cepa A34 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* en una placa de cromatografía en capa fina de fase reversa Whatman Partisil® LKC₁₈ y se dejó secar. También se aplicaron las siguientes AHLs estándar (Fluka®): C₆-HSL (804 pmoles) y C₈-HSL (31,6 pmoles).
- 2- La placa se introdujo en una cubeta de cromatografía, anteriormente equilibrada durante 1-2 horas con metanol al 70%, y las AHLs se separaron por capilaridad utilizando como fase móvil metanol al 70% hasta que el frente alcanzó la parte superior de la placa.
- 3- Se extrajo la placa del tanque y se dejó secar al aire.

3.5.3.2. Detección de las AHLs en la placa de cromatografía en capa fina

- 1- Se subcultivaron 250 μL de un cultivo de 24 horas de *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 pZLR4 en medio LB Gm (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 25 mL de medio mínimo MGM con gentamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y se incubó a 30°C con agitación (150 r.p.m.) durante 6-8 horas.

- 2- Se mezclaron 25 mL de cultivo con un volumen de agar al 1,5% y se adicionó X-Gal a una concentración de 80 µg/mL.
 - 3- Se extendió la sobrecapa sobre la placa de cromatografía en capa fina y se incubó a 30°C durante toda la noche. Las AHLs se detectaron como manchas azules sobre el fondo blanco.
-

- Medio MGM: Na₂HPO₄, 11 g; KH₂PO₄, 3 g; NaCl, 0,5 g; glutamato, 1 g; manitol, 10 g; biotina, 1 mg; CaCl₂, 27,8 mg; MgSO₄, 246 mg; agua destilada, c.s.p. 1 litro.

4. RESULTADOS

4.1. OBTENCIÓN DE CEPAS MUTANTES DERIVADAS DE *Rhizobium leguminosarum* BV. *viciae* CEPA Z25 NO PRODUCTORAS DE RIZOBIOCINA. CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL *LOCUS/LOCI* CODIFICANTE DE LA PRODUCCIÓN DE RIZOBIOCINA EN EL GENOMA DE *Rhizobium leguminosarum* BV. *viciae* CEPA Z25

4.1.1. Mutagénesis al azar

La mutagénesis al azar mediante inserción del transposón Tn5 se realizó por conjugación de la cepa Z25 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* con la cepa S17.1 de *Escherichia coli* portadora del plásmido suicida pSUP2021. Este plásmido posee una inserción de Tn5 que a su vez contiene el gen de resistencia a la kanamicina. La conjugación fue posible gracias a que la cepa S17.1 porta los genes necesarios para la conjugación.

El producto de la conjugación se extendió en placas de medio Y Km 200, pues de esta manera se evita el crecimiento de colonias de *E. coli* (que no puede desarrollarse en medio mineral), y seleccionamos únicamente las transconjugantes de *Rhizobium* en las que se haya insertado el transposón Tn5 en su genoma confiriéndoles así resistencia a kanamicina. De este modo se consiguieron aproximadamente 8.000 cepas mutantes de la cepa Z25 resistentes a kanamicina.

4.1.2. *Screening* de las cepas mutantes para la detección de fenotipos Bac^-

Las cepas mutantes Km^r se sembraron en estría en placas de medio Y Km 200, y por picadura en placas de medio TY con agar al 2 % para hacer el ensayo de producción de

bacteriocinas. Tras el *screening* de las primeras 2.000 cepas, se encontraron 4 cepas mutantes incapaces de producir bacteriocinas (fenotipo Bac⁻) y otra mutante que parece producir bacteriocinas pero de manera reducida (Bac reducida) tal y como vemos en la Tabla 4.1:

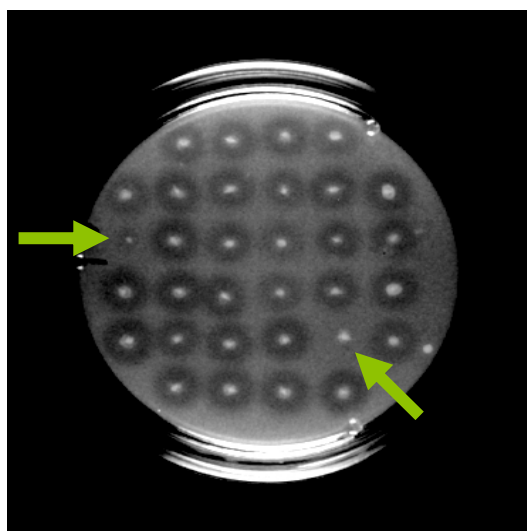
Tabla 4.1: Mutantes de la cepa Z25 con fenotipo Bac⁻ y Bac reducida.

Bac ⁻	Bac reducida
225	1626
1827	
4420	
5025	

Ninguna de estas 5 cepas mutantes estaba perjudicada en el crecimiento, y se comprobó que todas ellas seguían siendo inmunes a la bacteriocina producida por la cepa silvestre, enfrentándolas a ésta mediante el ensayo de antagonismo diferido.

En el transcurso del *screening* se encontraron otras cepas mutantes reducidas en la producción de bacteriocinas pero que al mismo tiempo estaban afectadas negativamente en su crecimiento, por lo que fueron descartadas para estudios posteriores (Figura 4.1).

Figura 4.1: *Screening* para la detección de la producción de bacteriocinas. Las flechas nos señalan la ausencia de halo de inhibición en dos de las colonias analizadas, debido a la falta de producción de bacteriocinas. La colonia señalada por la flecha de la derecha corresponde a la mutante 1827. La colonia señalada por la flecha de la izquierda estaba perjudicada en su crecimiento por lo que no fue seleccionada para posteriores estudios.



4.1.3. Perfil de plásmidos nativos de la cepa Z25 e hibridación de los plásmidos de las cepas mutantes con una sonda de Tn5

En primer lugar se llevó a cabo una electroforesis en sistema horizontal por el método “Back trap” de la cepa Z25, para la detección de plásmidos y megaplásmidos. Como marcadores se emplearon dos cepas con plásmidos de tamaño conocido, como son el plásmido pRL1JI de la cepa A34 de *Rhizobium leguminosarum* (8401 pRL1JI) (Johnston et al., 1978), y los cuatro plásmidos nativos de la cepa Sp7 de *Azospirillum brasilense* (Döbereiner y Pedrosa, 1987). El gel nos llevó a la conclusión de que la cepa Z25 posee tres megaplásmidos de aproximadamente 150 MDa, 360 MDa y más de 370 MDa (Figura 4.2).

A continuación se realizó la misma electroforesis con la cepa Z25 y cuatro de sus mutantes (225, 1827, 4420 y 5025) empleando como marcador la cepa A34. Con este gel se llevó a cabo una hibridación, utilizando como sonda un fragmento *Hind*III de 3,5 kb del transposón Tn5 previamente marcado con digoxigenina. El resultado de esta hibridación nos mostró que los genes responsables de la producción de la bacteriocina se encuentran en el megaplásmido de 360 MDa en todas las mutantes (Figura 4.3).

Figura 4.2: Gel de megaplásmidos de la cepa Z25. Se observan tres megaplásmidos de 150, 360 y más de 370 MDa. Los tamaños de referencia son los previamente publicados para los plásmidos de las cepas A34 (Johnston et al., 1978) y Sp7 (Döbereiner y Pedrosa, 1987) empleadas como estándar.

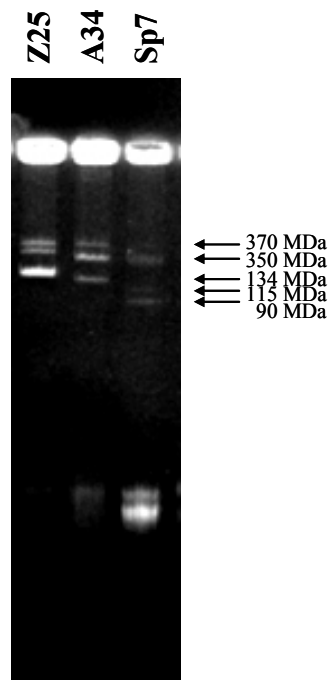
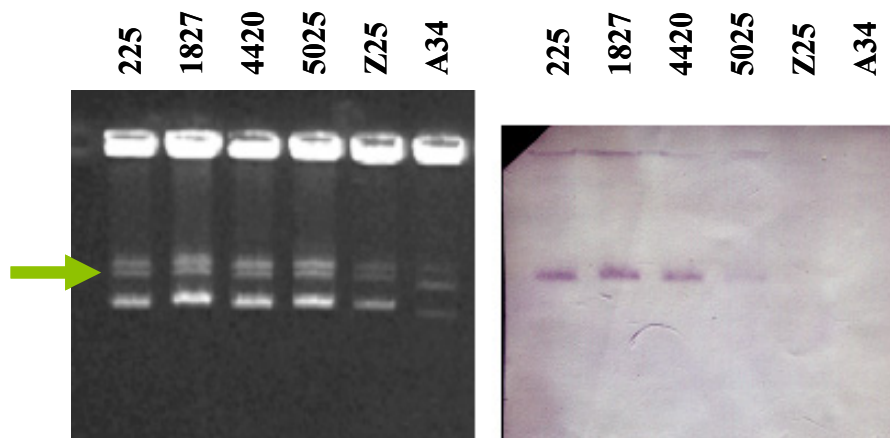


Figura 4.3: Gel de megaplásmidos de la cepa Z25 y mutantes e hibridación con la sonda de Tn5. Se puede ver que en las cuatro mutantes la sonda hibrida con el megaplásmido de 360 MDa.



4.1.4. Mapeo de las inserciones del transposón Tn5 que producen los fenotipos Bac⁻

En primer lugar se obtuvo el ADN total (ADN genómico) de la cepa Z25 y de cuatro de sus mutantes (225, 1827, 4420 y 5025) para realizar un mapeo de la región donde se localizan las inserciones de Tn5. Para esto se hicieron digestiones del ADN total con las enzimas *EcoRI*, *BamHI* y la combinación de ambas, y posteriormente se realizó una electroforesis de los fragmentos de restricción (Figura 4.5).

A continuación se efectuó una hibridación utilizando la misma sonda de Tn5 del apartado anterior (Figura 4.5). En las cuatro mutantes la sonda hibrida con una banda *EcoRI* de unas 12 kb (después de restar las 5,7 kb que corresponden al transposón Tn5). Los patrones de hibridación que nos dieron las digestiones *BamHI* y *EcoRI-BamHI* sirvieron para construir el mapeo provisional de la zona. Se pudo situar el lugar de las 4 inserciones de Tn5 en una región de aproximadamente 4 kb (Figura 4.4).

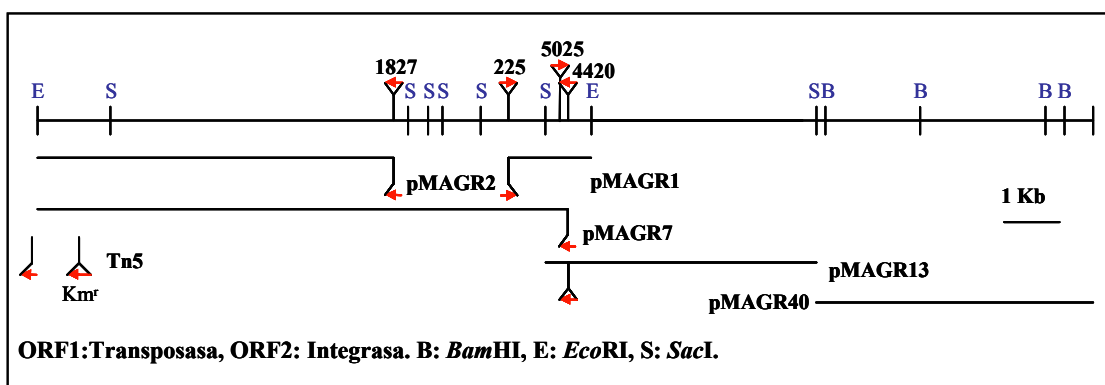


Figura 4.4: Mapa de la región responsable de la expresión de la bacteriocina con las inserciones de Tn5. Los plásmidos pMAGR1, pMAGR2 y pMAGR7 se obtuvieron por clonación de fragmentos *EcoRI-BamHI* del genoma de las mutantes 225, 1827 y 4420. El plásmido pMAGR13 se obtuvo por clonación de un fragmento *SacI* del genoma de la mutante 4420. El plásmido pMAGR40 se construyó por clonación de un fragmento *SacI-EcoRI* amplificado por PCR inversa.

4.1.5. Clonación de fragmentos de la región donde se produjeron las inserciones, subclonación y posterior secuenciación

A partir de los datos de la hibridación (Figura 4.5), se vio que era factible clonar fragmentos *EcoRI-BamHI* a partir del ADN de las mutantes 225, 1827 y 4420. Para ello se hicieron digestiones del ADN genómico de estas mutantes con las enzimas *EcoRI-BamHI* y posteriormente se ligaron con el plásmido pBluescript II KS (-) digerido a su vez con las mismas enzimas. Cada ligación se transformó en células competentes de la cepa DH5 α de *E. coli* y se extendió en placas de medio LB adicionado de kanamicina. Al cortar el transposón Tn5 con *BamHI* el gen de resistencia a la kanamicina queda completo en una de las dos mitades. Las colonias resistentes a dicho antibiótico fueron seleccionadas y se extrajo su ADN plasmídico mediante la técnica de lisis alcalina. Los clones se comprobaron mediante digestión con las enzimas *EcoRI-BamHI* y posterior electroforesis. Los clones recibieron el nombre de pMAGR1, pMAGR2 y pMAGR7 respectivamente (Figura 4.4). A partir de estos plásmidos se hicieron subclones (ver Material y Métodos, Tabla de plásmidos), que se emplearon para secuenciar la región mediante el empleo de los cebadores universal y reverso, y cebadores de diseño.

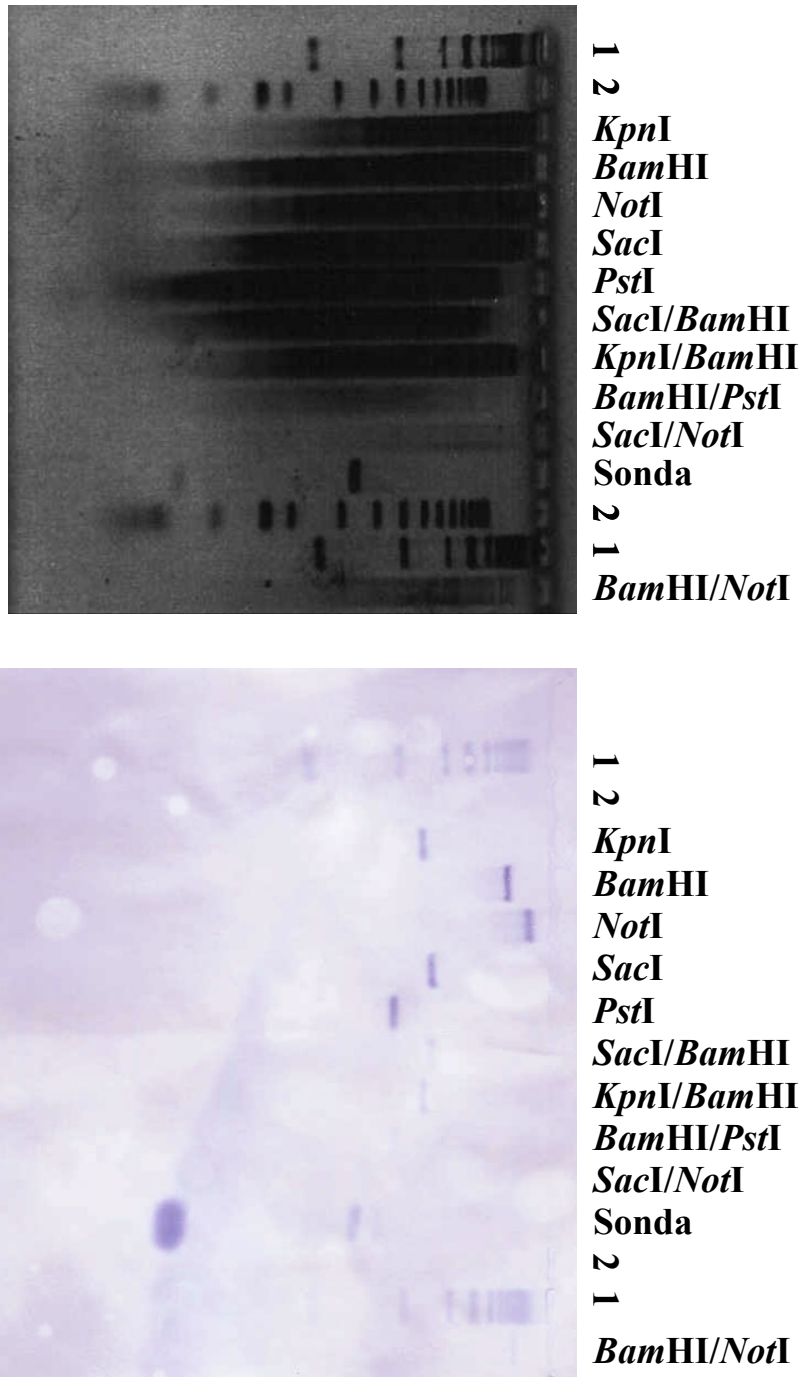


Figura 4.6: Electroforesis de digestiones de ADN genómico de la cepa Z25 con distintas enzimas e hibridación con una sonda de 0,7 kb de la región de la bacteriocina. La calle 1 muestra el marcador lambda *HindIII* y la calle 2 muestra el marcador escalera de 1 kb.

Con la anterior estrategia se consiguió secuenciar un fragmento *EcoRI* de 13,374 kb. El siguiente paso consistió en hacer una hibridación que proporcionara la información necesaria para clonar una banda adyacente a la banda *EcoRI*. Para ello se llevaron a cabo digestiones de ADN genómico de la cepa Z25 con varias enzimas (*KpnI*, *BamHI*, *NotI*, *SacI*, *PstI*, *SacI/BamHI*, *KpnI/BamHI*, *BamHI/PstI*, *SacI/NotI*), y a continuación se realizó una electroforesis de los fragmentos de restricción. Posteriormente se hizo una hibridación usando como sonda un fragmento *ClaI/EcoRI* de 0,7 kb de la región ya secuenciada del fragmento *EcoRI* de 13,374 kb (Figura 4.6 y Figura 4.7). Esta sonda se construyó mediante la digestión del plásmido pMAGR3 con las enzimas *ClaI* y *EcoRI*, seguida de una electroforesis en gel de agarosa para escindir el fragmento y extraer el ADN. Gracias a los resultados de la hibridación y a los mapeos anteriores se observó la existencia de una banda *SacI* de unas 7 kb que debía abarcar una zona adyacente a la región ya secuenciada. Por lo tanto, se decidió clonar la banda *SacI* a partir del ADN de la mutante 4420 por ligación con el plásmido pBluescript II KS (-) y transformación en células competentes de la cepa DH5 α de *E. coli*. Esta banda *SacI* contiene el transposón Tn5 completo, por lo que su tamaño es de más de 12 kb en vez de 7 kb, y como incluye el gen de resistencia a la kanamicina este se volvió a emplear para seleccionar los clones en LB Km. Después de extraer el ADN plasmídico por lisis alcalina y comprobar los clones por digestión y electroforesis en gel de agarosa, se obtuvo el plásmido pMAGR13. A partir de este plásmido se construyeron subclones para secuenciar esta zona con los cebadores universal y reverso, y cebadores de diseño (ver Material y Métodos, Figura 3.1).

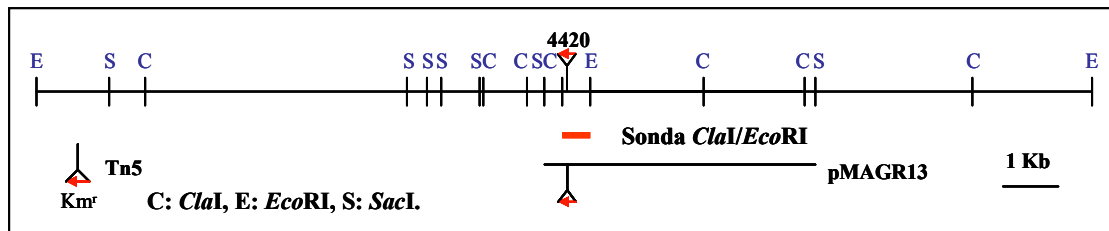


Figura 4.7: Mapa de la región responsable de la expresión de la bacteriocina en el que se puede ver la sonda empleada en la hibridación que dio la información necesaria para clonar la banda *SacI* adyacente a la banda *EcoRI*.

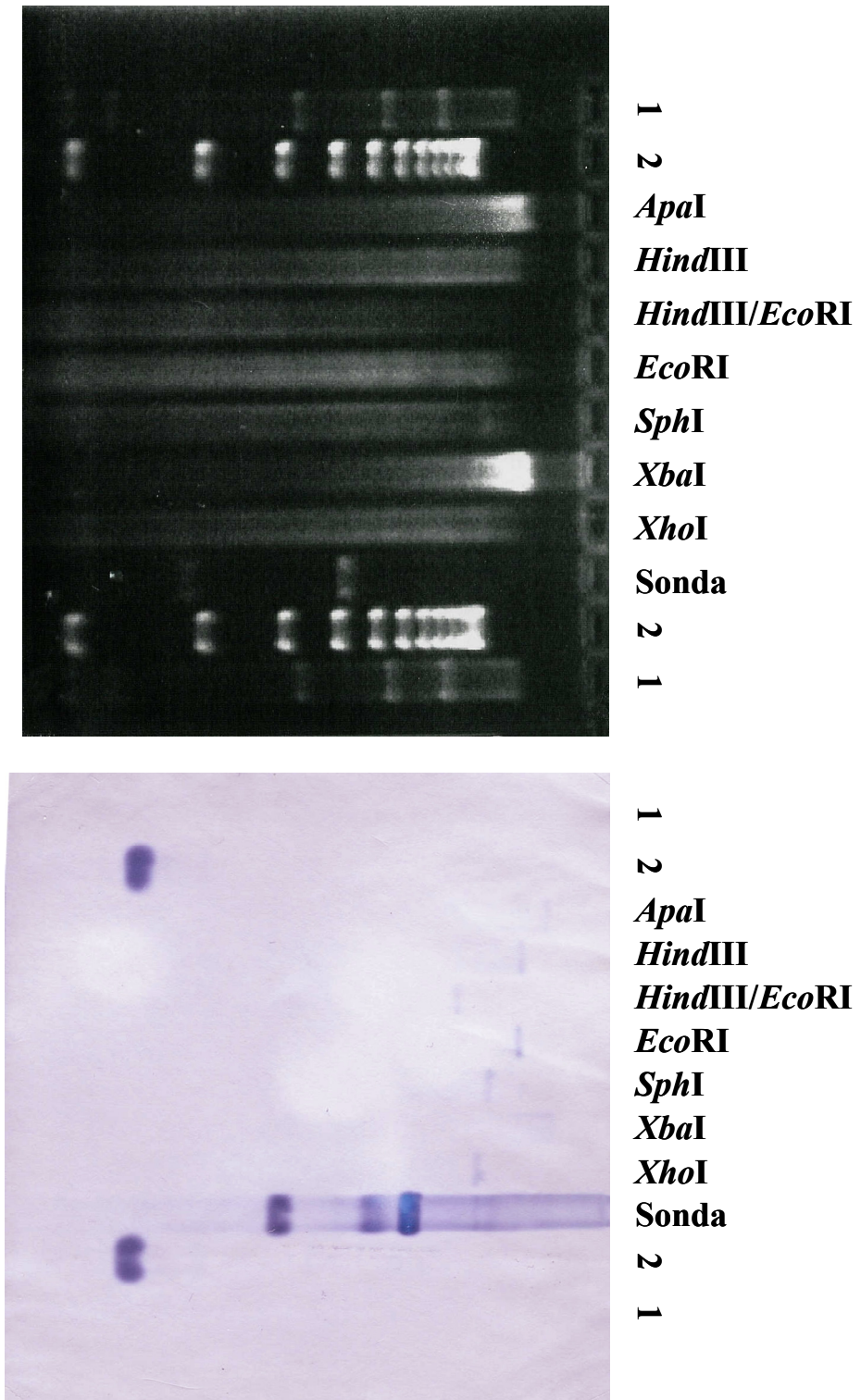


Figura 4.8: Electroforesis de digestiones de ADN genómico de la cepa Z25 con distintas enzimas e hibridación con una sonda de 5,4 kb de la región de la bacteriocina. La calle 1 muestra el marcador lambda *HindIII* y la calle 2 muestra el marcador escalera de 1 kb.

Por último, para clonar una banda adyacente a la banda *SacI* de 6,542 kb se tuvo que recurrir a una estrategia de PCR inversa. Se empleó como sonda un fragmento *EcoRI/SacI* de 5,4 kb de la región de la bacteriocina marcado con digoxigenina (Figura 4.9). La sonda se construyó mediante la digestión del plásmido pMAGR15 con las enzimas *EcoRI* y *SacI*, seguida de una electroforesis en gel de agarosa para escindir la banda y extraer el ADN, y posterior marcaje con digoxigenina. Se realizaron digestiones de ADN genómico de la cepa Z25 con las enzimas *ApaI*, *HindIII*, *HindIII/EcoRI*, *EcoRI*, *SphI*, *XbaI* y *XhoI*, y se hizo una electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de restricción. A continuación se realizó una hibridación utilizando la sonda anteriormente mencionada (Figura 4.8). A partir de los datos de esta hibridación y de mapeos anteriores se observó la existencia de una banda de hibridación *EcoRI* de 11,5 kb que debía abarcar una zona de unas 7 kb adyacente al fragmento *SacI* ya secuenciado. Por lo tanto, se seleccionó este fragmento de restricción *EcoRI* para llevar a cabo la amplificación por PCR inversa, según el protocolo descrito en el apartado de Material y Métodos.

Se emplearon como cebadores los oligonucleótidos PRI1 y PRI2 en la primera PCR y los oligonucleótidos PRI3 y PRI4 en la segunda PCR (Figura 4.10). El producto de la segunda PCR se ligó con el vector pGEM®-T, la ligación se transformó en células competentes de la cepa DH5 α de *E. coli* y se extendió en una placa de medio LB Ap con X-Gal e IPTG. El ADN plasmídico de los clones resultantes se extrajo por lisis alcalina, se digirió con enzimas de restricción y se hizo una electroforesis en gel de agarosa para comprobar los clones en función del tamaño. El clon correcto recibió el nombre de pMAGR40. A partir de él se hicieron subclones para secuenciar la banda *SacI/EcoRI* con los cebadores universal y reverso, y con cebadores de diseño.

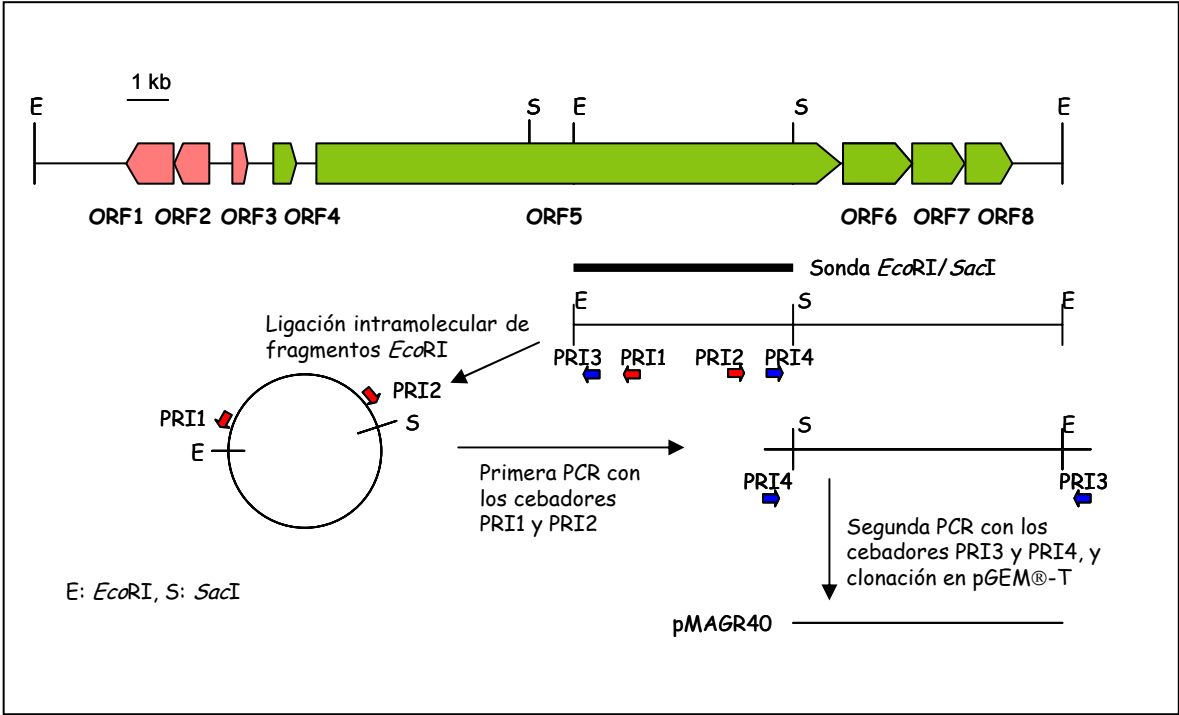


Figura 4.9: Estrategia de amplificación de la banda *SacI/EcoRI* por PCR inversa. Se puede ver la sonda *EcoRI/SacI* empleada en la hibridación que dio la información necesaria para llevar a cabo la PCR inversa. En el caso de la enzima *SacI* solo se han indicado las dianas de interés.

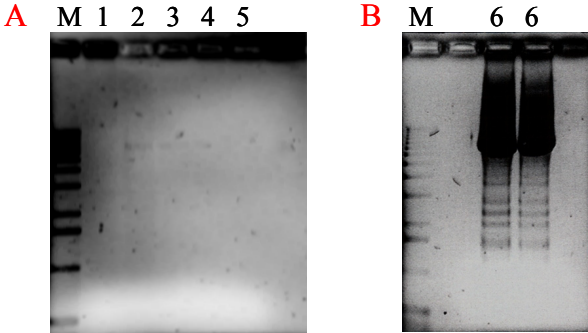


Figura 4.10: Electroforesis de los productos amplificados en la primera PCR con los cebadores PRI1 y PRI2 (A) y de los productos amplificados en la segunda PCR con los cebadores PRI3 y PRI4 (B). M: marcador de 1 kb; 1: control negativo (sin ADN molde); 2-5: productos amplificados por PCR empleando como ADN molde las religaciones de las diluciones 1, 1/20, 1/40 y 1/80 de las digestiones *EcoRI* del ADN genómico de la cepa Z25, 6: producto amplificado por PCR empleando como ADN molde el producto de la primera PCR correspondiente a la calle 3.

4.2. ANÁLISIS PREDICTIVO DE LA REGIÓN SECUENCIADA

4.2.1. Análisis predictivo de la secuencia y caracterización de los posibles marcos abiertos de lectura

La secuencia de la región responsable de la expresión de la bacteriocina tuvo una longitud total de 24,990 kb (Figura 4.11) con un porcentaje de G+C de 57,77%. Al analizarla se observó la existencia de ocho posibles ORFs (marcos abiertos de lectura) (Tabla 4.2). Los dos primeros se transcriben desde la hebra complementaria, al contrario que el resto de los ORFs. El ORF de mayor longitud es donde se localizan las cuatro inserciones de Tn5 (ORF5). En la región que se encuentra en 5' con respecto al ORF4 se encontraron tres secuencias palindrómicas imperfectas solapadas (Figura 4.12).

Tabla 4.2: Posibles ORFs encontrados. Se indica la posición en la secuencia, el tamaño en pares de bases, el porcentaje de G+C y la hebra en la que se encuentra cada uno (+ directa, - complementaria).

ORF	Posición	Tamaño (pb)	G+C (%)	Hebra
ORF1	3460-2285	1176	62,33	-
ORF2	4334-3474	861	60,98	-
ORF3	4906-5289	384	60,16	+
ORF4	5920-6489	570	54,74	+
ORF5	6990-19994	13005	57,80	+
ORF6	20049-21764	1716	61,13	+
ORF7	21761-23071	1311	58,89	+
ORF8	23077-24243	1167	55,70	+

Figura 4.11: Secuencia de nucleótidos de la región responsable de la expresión de bacteriocina en *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* cepa Z25. Se han indicado los siguientes genes: **transposasa en color azul, **integrasa** en color celeste, **ORF3** en color verde, **rzcC** en color naranja, **rzcA** en color rojo, **rzcD** en color fucsia, **rzcE** en color rosa y **rzcF** en color violeta. Los codones de inicio de traducción se muestran en **subrayado continuo**, los codones de terminación en **negrita**, y los posibles sitios de unión a ribosoma en **subrayado punteado**. Los posibles sitios de inicio de transcripción (+1) de ORF3, rzcC y rzcA según el programa BDGP *Neural Network Promoter Prediction* se han indicado en **negrita** y con **sombreado gris**.**

```

GAATTCCTCATGGAGGATCTCGAGAAGCTCGTCCGAGTTCCTCGCTGTTTGCGAAGAGGCATATGGTTGAGGGATGATTTCA 80
CTTAAGGAGTACCTCCTAGAGCTCTTGAGCAGGCTCAAGAGCGACAAAACGCTTCTCCGTATACCAACTCCCTACTAAAGT 80

TCTTGGAGAGCAATGATCGTAGGCGGCTTGAAATGATTTTGAAAAAGTCAGGCACTTGGCCTGATTTCTACTGTTGTTGCC 160
AGAACCTCTCGTTACTAGCATCCGCCGAACCTTACTAAAACCTTTTTCAGTCCGTGAACCGGACTAAGATGTGACCAACGG 160

CTAAACCACAAAATCGTAAATGGCTGATGATCCGTCCTCAATAAAGGAGGCCGAGACTTGACCTTTCCTTCGTTAGTGGGT 240
GATTTGGTGTGTTAGCATTTAACCGACTACTAGGCAGGATTTATTTCCCTCCGGCTCTGAACTGGAAAGGAAGCATCACCCA 240

CGGCAATTTTGTATCGCGATGCAGACGCAGGTCGACAAAATACGATCGAAGATTACGTCCAAAATGATTGGTGTAAAGGG 320
GCCGTTAAAACAGTAGCGCTACGCTCTGCGTCCAGCTGTTTTATGCTAGCTTCTAATGCAGGTTTACTAACCACATTCCCC 320

CGGTTGGTGGTTAGGAAGACGCCTTCCGCTGATGGCAACGAACCCGTTGGGGGGGGCCGCGGCCAAGATGAAGGCCCTGG 400
GCCAACCCACAACTCCTTCTGCGGAAGGGGACTACCGTTGCTTGGGCACCCCCCGGGCCGCGGTTCTACTTCCGGGACC 400

GGCGGCCGCTCATGACAAGGCTGACACCTTGGCCTAGCCCGCCGACGATAGGGGAACAATTGTGCTGTGCTTGGTTCA 480
CCGCCGGCGAGTACTGTTCCGACTGTGGAACCGGATCGCGCGCGGTGCTATCCCCTTGTTAACACGACACGAACCAAGT 480

AGCTGGGCCATAAACGCTTCGCAACTCCATTGCCGTCGATTAATCGAATCCACCCGCGATGAGCCGCAATGGTCCCCTT 560
TCGACCCGGTATTTGCGAAGCGTTGAGGTAACGGCAGCTAATTAGCTTAGGTGGCGCTACTCGCGGTTACCAGGGCAA 560

GGGATTAATAAATGAAAATAGGCGGCATTTGACAGATCCGAGTGGCCAGAGCTGCTGACCTTGCCCCAAGTTTTATCCA 640
CCCTAATTTTTAACTTTTATCCGCCGTAACCTGCTAGGCTCACCGGTCGACGACTGGAACGGGGGTTCAAAAATAGGT 640

GTTTTGAGTTCTCTCCAGCGGTTTTTGTAGTGTCCCGATTTTGGGCTAGCGGGAGCTGGAATTTCCGGGGTTTTGGCT 720
CAAACTCAAGAGAGGTGCGCAAAAACCTCACGAGGGGCTAAAACCCGATCGCCCTCGACCTTAAAAGGCCCAAAACCGA 720

CAGTTCGGCGGGGGTGCAGATGAGCCGTTTCATAAGCGAATCGGCACCTTGTGCGGATGGCGCTATGTGGCCGGAAC 800
GTCAAGCCGCCCCACGGCTACTCGGCAAGTATTCGCTTTAGCCGTGGAACAACGGCTACCGCGATACACCGGCCTTGAG 800

GTTATACAACACGACGACAGAACACCCACAGGACGGAGTTTCGTGAGCTTTTATATCCGTGGCATCCTTGGTGCAGT 880
CAATATGTTGTGCTGCTCTTGTGGGTGCTCCTGCTCCAAGCACTCGAAAATATAGGCACCGTAGGAACACGCGCAGT 880

CTCGTGCATGTCCATGATGCGCTGGCCAAAGGTATGGACATTTTCCGCTGCAGCTATCTGGTGCTTCTTCTGATCGGCT 960
GAGCACGTACAGGTACTACGCGACCGGTTTCCATACCTGTAAGGCGGACGTCGGATAGACCACGAAGAGACTAGCCGA 960

TTTTGAAGTCCCATCATGGATGTTTCGACCGTTCCGTGAGCGGATATTGGCGCAGCCTGCCAGTTCCGCATGTGATCTCG 1040
AAAACCTCAGGTTAGTACCTACAAGCTGGCAAGGCACTCGCCTATAACCGCGTCGGACGGTCAAGCGGTACAGCTAGAGC 1040

CGAGCCTGCATGCTTTGGCAAAGTTACTGAAAGACGCCGACGCTCATCGCAATCTGCGGTAATGGGCGCAGCATTGGTC 1120
GCTCGGACGTACGAAACCGTTTCAATGACTTTTTCGCGGCTGCGGAGTAGCGTTAGACGCCATTACCCGCGTCGTAACCAG 1120

TCTCACGAAAACGAGTCGGAGAGATGTCCATGCCTCGCCAGTCCATGACATGCCAGTTCGATCTGTTTTCGGCTCCGAGA 1200
AGAGTGTCTTGTCTAGCCTCTCTACAGGTACGGAGCGGTGAGTACTGTACGGTCAAGCTAGACAAAAGCCGAGGCGTCT 1200

GGGGATGACCGCAGGCATGCCACAATGGCCGAGTTGCCGGAGGAAACCCGCCAGGCGTGCAGGTTCTCATCGTGCAGC 1280
CCCTACTGGCGTCCGTACGGTGTACCGGCCCTCAACGGCCTCCTTTGGGCGGTCGCGACTGCCAAGAGTAGCACGCCG 1280

```

TGTTTCGTCGATCAGCAAACCTGCGAGCGCACCTCCCAGCAGAAGGAGGCCGGTCATGATGCATGAGAAGATCGGGCCGCA 1360
ACAAGCAGCTAGTGCCTTTGACGCTCGCGTGAGGGTCGCTTCTCCCGCCAGTACTACGTACTCTTCTAGCCCGGCGT 1360

CCATCTGGAGCGGAAGGCTATTTCTCTATGTTTCGGCAGTCTCGGCTCACAGGTTCTGCACAATCGCGAAAGCAGTACCC 1440
GGTAGACCTCGCCTTCCGATAAGAGATACAAGCCGTGAGGAGCCGAGTGGTCCAAGACGTGTTAGCGCTTTCGTCATGGG 1440

TTCAATACGCCATGCGCGATCGCCTGACAGCACTTGGTTGGTCGCGCATTGAGACGGTGGATGACGATCTTGGTCGTTTCG 1520
AAGTTATGCGGTACGCGCTAGCGGACTGTCGTGAACCAACCAGCGCTAACTCTGCCACCTACTGCTAGAACCAGCAAGC 1520

GCCGCCGGTGGTGTAAACCCGCGCTGGTTTTGACCGGATGGTCGCGAGGTCTGCCTTGGCAAGGTGGGGCGGTAGCGGC 1600
CGGGGCCACCACATTTGGGCGCGACCAAACTGGCCTACCAGCGGCTCCAGACGGAACCGTTCCACCCCGCCATCGCG 1600

ACGCGAGGTATCGCGTTTTGCCCGCAACAGCCGCGATTGGCAGCAGCTCATCGAGATGTGCCGCGTCGTTGATACCGTTC 1680
TGCGCTCCATAGCGCAAAACGGGCGTTGTTCGGCGCTAACCGTCGTCGAGTAGCTCTACACGGCGCAGCAACTATGGCAA 1680

TGATCGATCAGGAAGCGGTCTACGCACCACGCGAGGGCGATGACCGGTCGCTTGGGCCTGAAGGGCAGCCTCAACGAG 1760
ACTAGCTAGTCTTCGCCAGATGCGTGGTGCCTCCCGCTACTGGCCGACGAGAACCAGGACTTCCCGTCGGAGTTGCTC 1760

TATGAGCTCGATCTCTTACGTGAGCGTTCCCTTCTCCGCAAAACCGTAAGAAGCCCTTCCACTGCGCGGATGTCCCGA 1840
ATACTCGAGCTAGAGAATGCAGTCGCAAGGAAAGGAGCGGTTTGGCATTCTTCGGGAAGGTGACGCGCGCTACAGGGCT 1840

TGCCATGGACGCATCTCCGAATCACTAAGTCGCGACTCAAAGACGTGCGAAGGTGATTCGTTCCGACTCGAAACGAATC 1920
ACGGTACCTGCGTAGGAGGCTTAGTGATTACGCGCTGAGTTTCTGCACGCTTCCACTAAGCAAGGCTGAGCTTTGCTTAG 1920

ATTTTTCAATTATGGAATCTGGAGGGTTCTGTAGCCCGTTTCGCTATGCGTGCGGCATTCACTGATCGGACCTCATTGAAG 2000
TAAAAGTTAATACCTTAGACCTCCCAAGACATCGGGCAAGCGATACGCACGCCGTAAGTACTAGCCTGGAGTAACCTC 2000

CCGGATTGAGCGAAGGGCGGGTGTGGGCGCTATGGGATTTAGTCGAAGCGGTGGATGGCGTTTGGCAGAAATCGAGC 2080
GGCCTAACTCGCTTCCGCGCCCAACAAACCGCGATACCCCTAAATCAGCTTCGCCACCTACCCAAACCGTCTTAGCTCG 2080

CTTGCCGGAGCACCTGGACAGGTCTGGAAGGAGATTCTTCCCGGTATGCGGTGTCTTTGACGCTCCTGTGCGGCTGGTTTG 2160
GAACGGCCTCGTGGACCTGTCCAGACCTTCTCTAAGAACGGCCATACGCCACAGAACTGCGAGGACAGCCGACCAAA 2160

CATCGGCCGACCCCTTGGTTCTGTGGCGGTTTACGTGCTCAGGCACGCATTGGCCAAAACACTCGCCTCGCGGCTCCCG 2240
GTAGCCGGCTGGGGAACCAAGACACCGCCAAATGCAGCGAGTCCGTGCGTAACCGGTTTTGTGAGCGGAGCGCCGAGGGC 2240

GCATGCCGACGCTGATCGTTGCAATGATGCTGCGCGTGATATGATCATGAATGTCTTTCCATGCTGGCCGGGTACCCG 2320
CGTACGGCTGCGACTAGCAACGTTACTACGACGCGCACTATACTAGTACTTGACAGAAAGGTACGACCGGCCGATGGCC 2320

CTGGAGCGGGTCCATGCGCCGATGATTGTGATGGCTCCGCCACAACAGGGACAGCGATGCGCAAGGGTGGTGGCTTTG 2400
GACCTCGCCCCAGGTACGCGGCTACTAACAGTACCGAGGCGGTTGTTGCCCTGTCGCTACGCGGTTCCACCACCGAAAC 2400

CGTCCGTTCTTCGACCGGGTGTCCGGCGGGGACGTGAGCAGGCTTCGGCACAGATCCAGCTTACGTTGCCGATGG 2480
GCAGGCCAAGAAGCTGGCCACAAGGCCGCGCCCTGCAGCTCGTCCGAAGCGGTGCTAGGTGCAAGTCAACGGCTACC 2480

CCATTGGCAAGCAAGCCGAAGTGACGAATGCGGTGGAAGCCGTCCGGAACGGTGTGAAGCAGGAAACGGCGGATGAACTC 2560
GGTAACCGTTTCGTTCCGCTTCACTGCTTACGCCACCTTCGGCAGGCTTCCACACTTCGTCCTTTGGCGCCTACTTGA 2560

GTGGGCATCAAGCGTCATTACCTTTTGCCTGCGCCCGGTTTCGATAATCCTTCCATCGGAATGTGACGCGATCGCCATCGA 2640
CACCCGTAGTTTCGAGTAATGGAAAACGGACGGCGGGCAAGCTATTAGGAAGGTAGCCTTACACTGCGCTAGCGGTAGCT 2640

TGCTGACGAGGGCGGAATTGGAGATGGCAATGCGATGGGTATAGCGCCGAGATAGGCCAGCACCTGTTCCGGTCCGGCA 2720
ACGACTGCTCCGCCCTTAACCTTACCGTTACGCTACCCATATCGCGGGCTCTATCCGGTTCGTGGACAGCCAGGCCGT 2720

ATGGCGGCTTGGCGTAGACCACCCAGTCGACACGCGCGCTTCTTTGACGATGCGATTGAACGCGCGCGGATCGGCCAGG 2800
TACCGCCGAACCGCATCTGGTGGTTCAGCTGTGCGGCGGAAGAACTGCTACGCTAACTTGGCGCGGCTAGCCGGTCC 2800

CCGGCGATATCGCCAAACAACCGAAGCTGGCCAGGTCGTAGGCTGCTTACGCTCTTCGAGAAACAGCCCGCGGAACAG 2880
GGCCGCTATAGCGGTTTGTGGCTTCCAGCCGGTCCAGCATCCGGACGAAGTCGAGAAGCTCTTTGTCCGGCGGCTTGT 2880

GCGTGACAGAACCCGGCACGGGAGGAAGTTTGGCCGGCAGGCAACCCAGCGGGACTGGTCCGGCCGACAATCCGCCG 2960
CGCACTGCTTTGGGCGGTGCCGCTCTTCTCAAACGGGCGCTCCGTTGGGTGCGCCTGACCAGCCGGCTGTAGGCGGC 2960

Capítulo 4.2. Análisis predictivo de la región secuenciada

CCCGGCACGGTGAATGGATATGCGGGTGATAATGGAGCGTCTGGCCCCAGGAGTGCAACACCGCGATGAAGCCAATCTC 3040
GGGCCGTGCCACGTTACCTATACGCCCACTATTACCTCGCAGACCGGGTCTCACGTTGTGGCGCTACTTCGGTTAGAG 3040

TGCACCCAGATGCTTGGGATCGGCAGCAAGCCTGCGCAGCGTCTCGGGCAGAGCGGAAAAGAGGATCGTGTAAACGGCAT 3120
ACGTGGGTCTACGAACCCTAGCCGTCGTTTCGGACGCGTCGCAGAGCCGCTGTTCGGCTTTCTCCTAGCACATTTGCCGTA 3120

TTTTGTTCTGGAAGGCGATTGCGGGCATCTGCTGCGGTAGGGTAAAAACACGTGAAAATAGCCGACCGGCAGAAAGGTCG 3200
AAAACAAGACCTTCCGCTAACGCCGCTAGACGACGCCATCCACTTTTGGTGCACCTTTATCGGCTGGCCGCTCTCCAGC 3200

GCCTGCCGGGCAGCAAGCCAGTACGGCTCGCCTGTCCCTGGCACTTCGGGCAATGCCGTTGCGGCAGGAATTAATAGGC 3280
CGGACGGCCCGTCGTTCCGGTCAGTGCCGAGCGGACAGGACCGTGAAGCCGTTACGGCCAACGCCGCTTAATATCCG 3280

GATGCGGAACGCCGCGCAGTCTGACATTGCTGGACATGCCCGCCAGGCGAGCGGTCCGGCACATCTCGACCGCACTCA 3360
CTACGCCCTTGGGGCGGTCAGGACTGTAACGACCTGTACGGGGCGGTCCGCTCGCCAGGCCGTGTAGAGCTGGCGTGAGT 3360

TGACCCGGCGTTCGACACGCCCGAGATGAGCGTGTGTTTGGCGATATCTTTCCCGTGGCGGCGAAAATGTCCGCC 3440
ACTGGGCCGAAGCTGTGCGGGCTTACTCGCAGCACAAAACCGCTATAGAAAAGGGGACCGCCGCTTTTACAGGCGG 3440

ACCTGCAGTCCC GCCCATAGCGAAGCTATGCTCAGCCTGGCGGCACCACCTTAGCGTCAGCCGTCGAGCGGGCTGG 3520
TGGACGTCAGGGCGGCGTATCGCTTCGATACGAGTCGGACCGCGTGGTGGAGATCGCAGTCGGCCAGCTCGCCCGACC 3520

<- **Transposasa**

TCGTGCTGCGGATCAGCGTATTGGAACCTTTCGTGTAGCGTGCCTGGTGGACAGATTGTTGTGGCCGAGCAAAACCTGA 3600
AGCACGACGCTAGTCGCATAACCTTTGGAAGCACATCGCACGGCACCACTGTCTAACAAACACCGGCTCGTTTTGGACT 3600

ATGATGCGGATGTGCGTTCCGCTTTCCAGAAGATGGGTGGCAAAGCTGTGACGCGAGCTATGTACCGTCCCCCTTTGTG 3680
TACTACGCCTACAGCCAAGGCGAAAGGTCTTCTACCCACCGTTTCGACACTGCGTCGCATACATGGCAGGGGGAAAACAG 3680

GATGCCGGCAGCAGGGCACGCCAACCGGACAGGACAGAACCTGGACGTCATGGGCTTGGTCTCGTCCC GGCCCG 3760
CTACGGCCGTCGTCGCCGTCGGCTTGCCTCCGCTTCTGTCTTGGACCTGCAGTTACCGGAACAGAGCAGGGCCGGGG 3760

GGAACAGCCAGACCTCGGGTCTCGCCAGCCGCAATAGACCCGACAGGATCGCGAGCAACTGCGCTGACAGCATGACGTTG 3840
CCTTGTGCGTCTGGAGCCAGAGCGGTTCGGCGTTATCTGGCGTCTTAGCGCTCGTTGACGCGACTGTCTACTGCAAC 3840

CGATCCTTTCCGCCCTTGCCATGCTCGACGCGGATGATGCCCGCTCGCCATCAATGTGCGGACCCCTGAGATGGACAGC 3920
GCTAGGAAAGGGGGAACGGTACGAGCTGCGCCTACTACGGCGGAGCGGTAGTTACAGCGCCTGGGACTCTACCTGTCC 3920

TTCCGAGGCGCGCAGCCCCGCCGATAAGCTGTGCTCAATGCGGTGCGGGTCCCTCAGGCTCGGAACCGCTTCCAGAAACC 4000
AAGGCTCCGCGCTCGGGGCGGCTATTTCGACAGCAGTTACGCCACGCCAGGAGTCCGAGCCTTGGCGAAGGCTTTGG 4000

GCACGATCTCGTCGCGTTTAGGATCGTCGGAAGCTTGGCGGGTGTCCGGGCATAAGCAATGCGCTCCGGTATCTCGCCA 4080
CGTGCTAGAGCAGCGGCAAAATCCTAGCAGCCTTCGAACCGCCACAGGCCGATTCGTTACGGGAGGCCATAGAGCGGT 4080

TGACCAAGCGTGACGCCAAAGAAGAACCGCAGGGCACAACTGTCTGGTTCAAGGCCGCCATGATAGGCCCGATGAGAC 4160
ACTGGTTGCGACTGCGGTTTCTTCTTGGCGTCCCGTGTTCGACAGACCAAGTTCCGGCCGGTACTATCCGGGCTACTCTG 4160

CAGATGCACCTGAAACGCGCGCACGCTCTCCAGTCCAAGACGGTCTGGCGATCGCCCGAAATAGCGCGAGAACTTCGTCA 4240
GTCTACGTGGACTTTGCGCGCTGCAGAAGGTCAGGTTCTGCCAGACCGCTAGCGGGCTTTATCGCGCTCTTGAAGCAGT 4240

CCGCATGCAAATACGATCGTTGCGTTCGCTGGCGAAAGATTGCGGATCGTCATGTCATCGATCATGCGCCGGCGTAGCGGG 4320
GGCGTACGTTTATGCTAGCAACGACGCGACCGCTTTCTAACGCTAGCAGTACAGTACGTAAGTACGGCCGCGATCGCCC 4320

CTTATCTCTGTCACTGTCATCTCTCTGTTCAAAGGTCGGGCTAAAACAGCCCAATCCTTCAAATCAGAAGCGCATCATGCA 4400
GAATAGAGACAGTAGCAGTAGAGGACAAGTTTCCAGCCGATTTTGTGCGGTTAGGAAGTTTAGTCTTCCGCTAGTACGT 4400

<- **Integrasa**

ATCCC GCGCTCCAAATGCCGCGATAGCGGCTTCGTTCAATCTTCTTTCAGACAGTGATTGTTCTCTCTGGCTGGTTCGCGCT 4480
TAGGGCGCGAGGTTTACGGCGCTATCGCCGAAGCAAGTTAGAAGAAGTCTGTCACTAAACAGAGAGACCGACCAACGCGA 4480

GGTGGTATTCGTAAAGGCGGTGGTAGCAAAAAACAGCATGATCGTAGCTCGCGAGCCATGAGCAGGTTCCGGTTTGGAGT 4560
CCACCAATAAGCATTTCCGCCACCATCGTTTTTTGTCGTA TAGCATCGAGCGCTCGGTACTCGTCCAAGGCCAAACCTCA 4560

CGGACTACCCGTCGCGATACTCCTGGGAGTTACTGGAATCCC GGCGAGTTTCTTCTGGGGTGCATAAACGTTGGCATCG 4640
GCCTGATGGGCAAGCGCTATGAGGACCTCAATGACCTTAGGGCCGCTCAAAGAAGACCCACGTAATTTGCAACCGTAGC 4640

GTCCAGGTCGGCAGGAGTGGACTGAGTCAGAAAACAGCGAACGCTTGCGGCGATTTCGGTCAGGTCGCTATCGTGACGACGC 4720
 CAGGTCAGCCGCTCCACCTGACTCAGTCTTTGTGCGTTGCGAACGCCGCTAAGCCAGTCCAGCGATAGCACTGCTGCG 4720

 TCCCAGCATCGTGCAAGTTGCAATGAGTGTCTTCGCGCTCAGTGACCCCTCTAAGAGGTGACTTGCGAAATCCTTAAGA 4800
 AGGGCGGTAGCACGCTTCAACGTTACTCGACGAAAGCGCGAGTCACTGGGAGATTCTCCACTGAACGCTTTAGGAATCT 4800

 GTGTATTTAATTCTTCTTGGCAACCCTGGGTGAGGGGATGATTATGCTCAAGATCGTGGCTGCAATCCTATTTCTATTT 4880
 CACATAAATTAAGAAGAACGGTTGGTGACCCACTCCCTACTAATACGAGTTCTAGCACCGACGTTAGGATAAAGATAAA 4880

 GTCGGGCTCTTGAAGTTCAGCTC**GTGAGGTCAAGCGCGGCTCCGCGCGCAGGGTCTCATTTCGACCTGTTTCATGC** 4960
 CAGCCGAGAAAGCTTGAAGTCGAGCACTCCAGTTTCGCGGCCGAGGGCGCGTCCAGAGTAAAAGCTGGACAAGTACG 4960

GATTCGGCGCCATCACAGTGAATATGCCCTTCGTGGCGGGTCTGGGTTCCGCATGGACCACCGTTTACCTTGGTG 5040
 CTAAGCCGCGGTAGTGTCACTACTTATACGGGAAGCACCGCCACGACCCAAAGCGTACCTGGTGGCAAAGTGAACCCAC 5040

AGCGTCTCCGCCTTTTTTGGCGGCCCGTCTCCCTACTCGTCAACCGCGGGATGGCCGTGGCTATCGAATCTACATCGG 5120
 TCGCAGAGGCGGAAAAAACCGCGGGGCGAGGGATGAGCAGTGGCGGCCCTACCGCGACCGATAGCTTAGATGTAGCC 5120

CGGGATGGCGCGATAACAGGACTGATCGGCATAGGAGTTTCGAGCATCGTCCGTTTACTGCTCACTATCTGACGCGAT 5200
 GCCCTACCGCCGCTATTGCTCTGACTAGCCGTATCCTCAAAGCTCGTAGCAGCAAACCTGACGAGTATAGACTGCGCTA 5200

CACCGAAGATTTGGCATGTCTTGTGTTTTCCGCGCGGTGCGGTTAGGGGTAGGCGCAGGGCTTTTTCTGTTGCCGCA 5280
 GTGGCTTCTAAACCGTACAGAACGACAAAAGCGCGGCCACGGCAATCCCATCCGCGTCCCGAAAAGGACAACGGCGGT 5280

GCCCTCTGACCACCGCGAGGCGGATAGGCAACGCGCTCACGTATTTCAAATTGCGAGGGCAACGCCAATTCCTACTGA 5360
 CGGGAGACTGGTGGCGCTCCGGCTATCCGTTGCGCGAGTGATAAAGTTTAAACGCTCCCGTTGCGGGTTAAGGTGACT 5360

 CGTCTGTGGTGTGCGGAGCGAGGCCAAAATGACGATCAGAAAGACGAGACAACGGACCAGGAGATCAGGCGATAAGA 5440
 GCAGGACACCGACAGCCGTCGCTCCGTTTTACTGTAGTCTTTCTGCGTCTGTTGCCTGGTCTCTAGTCCGCTATTTCT 5440

 TCGCACACTCAAACGTTCCCCCTTAGCTCGAACACGGCATATAAAACATTGATCAGCGCAGGCTCAACTTATTAGGCTC 5520
 AGCGTGTGAGTTTGAAGGGGAATCGAGCTTGTGCCGTATATTTTGAACCTAGTCCGCTCCGAGTTGAATAATCCGAG 5520

 GGGCGCGCTTCTCGTTATTGCTCTGTTGAGGACTCTCGCCCGCACACTCGTTGCGATTGACCCCGCGGCGACTCCG 5600
 CCCGCGCGAAGAGCAATAACGGAGGACCACTCCTGAGAGCGGGCGTGTGAGCAACGTCAACTGGGGCGCGCTGAGGC 5600

 GCCAAATGTGAGTCCGTCGGCTCTCGCACGATAGATGTAGCGGCTCGCGAGGCGATTTGGATTGATCTGACCAACC 5680
 CGGTTTACAGTCAAGGACCGAGAGCGTGCCTATCTACATCGCCGAGCGCTCCGTCATAAACCTAACTAGACTGGTTGG 5680

 GTCAGGATGTGTCGGAAGTGGCCGTTCTGTCGGGTGCAATGGAGTTGACCGTGGCTGTGCTATCGTTTGGTACC GC 5760
 CAGTCTACGACAGCCTTTCACCGGCAAGCAGCCACGTTACCTCAACTGGCAGCCGACAGCGATAGCAAACCGATGGCG 5760

 TTTTGCTCAGACGAAGAAATATTCACCCCAAGAGAGCATCGCGATGCAATTTCACTTGCAATTGTAATTTCAATTTGTAA 5840
 AAAACGAGTCTGCTTCTTTATAAGTGGGGTCTCTCGTAGCGCTACGTTAAAGTGAACGTTAACATTTAAGTTAAACATT 5840

 TCTCCATCAGCAATCCGAGTTGGGACGATTGCAACTATATCGGGCTATTTTGGCGGTAACCCATGGGGCTGGGATACA 5920
 AGAGGTAGGTCGTTAGCTCAACCCTGCTAACGTTGATATAGCCGATAAAAACGGCCATTGGGTACCCGACCCCTATGT 5920

TGAATAACATTTGCGACGGAAGTGTCCGGCTAATTCAAGTCAAAACGCATTATCTGAAGAGACCAAGAAGAACTTGCTGGA 6000
 ACTTATTGTAACGCTGCCTTACAGCCGATTAAGTTCAGTTTTCGCTAATAGACTTCTCTGGTCTTCTTTGAACGACCT 6000

GCTAAGGCGGCAATTGCAATCAACCTTTGGGCAGGTTGTTCTCGCGATGAGCACAGTGGCCGCTACCGCAGTCAGATGCT 6080
 CGATTCCGCGTAACGTTAGTTGGAACCCGTCACAACAGAGCGCTACTCGTGTACGGCGCGATGGCGTCAGTCTACGA 6080

GTCCGACCTCCACCATCTAGTTGTGATCCTTTGATTAACGACCGCATTGCCATTGCGATGCCCAAGGCCGACACAGGCA 6160
 CAGGCTGGAGTGGTAGATCAACAGCTAGGAACTAATGCTGGCGTAACGGTAACGCTACGGGTTCCGGCTGTGTCCTG 6160

TTGAACCGCGGCAATTGCTATCTGGGCGCGGTCAGCGCCGAGGTTGATGCGCGAATTTCCGGAACAGGCTAAAGCGGGT 6240
 AACTTGGCGGCGTTAACGATAGACCCGCGCCAGTCCGCGCTCAACTACGCGCTTAAAGCCTTGTCCGATTTTCGCCCA 6240

GGGTTCCCGGTCGGCTGAAGCCGGAAGACTGGAAGAGTGGTGACATGTTTGGCTGCTCGACGTTGATCGCGCCAACCGG 6320
 CCCAAGGGCCAGGCGACTTCGGCCTTCTGACCTTCTACCCTGTAAACAAACCGACGAGCTGCACTAGCGCGGTTGCGC 6320

Capítulo 4.2. Análisis predictivo de la región secuenciada

CGAACTGGCAACGATGGTGTACGAATTTCCACCAGGTTGCGAAGCAAGACAACATCAAGATCCACCCGATGGTCGCGC 6400
GCTTGACCGTTGCTACCACGATTGCTTAAAGGTGGTCCAACGCTTCGTTCTGTTGTAGTTCCTAGGTGGGCTACCACGCGC 6400

ACCTCGTTGATCCTGAGGTTCTTTCGAAACTCTCCAAATCCCCCAAGCGTCGGCCACGGCGAGCAACACGCGAATACT 6480
TGGAGCAACTAGGACTCCAAGAACGCTTTGAGAGGTTTTAGGGGGTTCGCAGCCGGTGCCGCTCGTTGTGCGCTTATGA 6480

TTGAAC**TGA**CGCCCGTAGGGCGTCAGTATCTCCGATCCTTTCGTTAGACAGGCATGTCGATTTATAGTGTGGCTGTTGCC 6560
AACTTGACTGCGGGCATCCCGCAGTCATAGAGGCTAGGAAAGCAATCTGTCGGTACAGCTAAATATCACACCGACAACGC 6560

CCTAATGGCGAGCGGAGTAGCATTAGTCTGATGCTAGCCTAGGATGTCGTGCTGAAAGCAGATGGTTATGATCTGAT 6640
GGATTACCGCTCGCCTCATCGTAAGTCAGGACTACGGATCGGATCCTACAGCAGGACTTTCGCTACCAATACTAGACTA 6640

CGCGAAGTAACTGCAACAATATAATTGCTTCTTCGAATTTGAGCGGAAATATGGGCAACTCCAAGATTGTACTTCCACAC 6720
CGCCTTCATTGACGTTGTTATATTAACGAAGAAGCTTAAACTCGCCTTATACCCGTTGAGGTTCTAACATGAAGGTGTG 6720

CCAAATGAAATCAATGAAGCGTTTTTCATACATAAAAACAAAACGCCAAAATTGATTGAAAATTAACAAAATCGTGCCGT 6800
GGTTTACTTTAGTTACTTCGCAAAAGTATGTATTTGTTTTCGCGTGGTTTTAACTAACTTTTAATGTTTTAGCGACGGCA 6800

GCAGCTTCTAAAGTGCCGATAGATTACAGCTTAAAGTACGAAGAAAGGGCAGCTAGAATAATTTGTCCTGATGATTACA 6880
CGTCGAAAGATTTACAGGCTATCTAATGTCGAATTCACGCTTCTTCCCGTCGATCTTATTAACACGGACTACTAATGT 6880

TAAATCTGCGAAATTACATAAACAGTACGCTACAAAGGAAATCTCCTGTGATTTGTCGCGCCTATATATGGGAATACAT 6960
ATTTAGACGCTTTAATGTATTTGCTACGCATGTTTCTTTTAGAGGACACATAAACAGCGCGGATATATACCCTTATGTA 6960

rzca ->

GATATTATTTATTTTCATCTGAGGCGTAGAGATGACCGGATATATCGTTGATACAGCTAATTTTTATACGCTCGTTTCGCATG 7040
CTATAATAATAAAGTAGACTCCGCATCTCTACTGGCTAATATAGCAACTATGTCGATTAATAATATGCGAGCAAGCGTAC 7040

AACGGTTCCTCCGGCCTGGAGGTA**CTTCAAGCGCTGATCGATGCAGGACACAAGATAGTTATCACTGATGCCGTGGAAGC** 7120
TTGCCAAGGAGGCGGACCTCCATGAAGTTCGCGACTAGCTACGTCCTGTGTTCTATCAATAGTGACTACGGCACCTTCG 7120

TGAGATAACTTTTTCTGCTGCGGCAC**TTTATAAGGATGCACAGATTGCGTCCGCCTGGATCAGAGCGCACCAAGTCCGAAA** 7200
ACTCTATTGAAAAAGACGACGCCGTGAAGTATTCCTACGTGTCTAACGAGCGGACCTAGTCTCGCGTGGTCAGGCTTT 7200

TCGAGATTGTACCAACTA**ATACTTTCCAAGACTTGTTC**CAAAACGGTTC**CAATGGGTCTCCTCTGCCAGAGATCTCGGC** 7280
AGCTCTAACATGGTTGATTATGAAAGGTTCTGAACAAAGGTTTTGCCAAGTTTACCCAGAGGAGACGGGTCTCTAGAGCCG 7280

GAAGAGTCAATTTTGTGGCTTGCAAAT**CTTCTCGCTATGCAGACAATCCTGCAATATTTGTTTTCCGACGACAGTAGTTT** 7360
CTTCTCAGTTAAACACCGAACGTTTAAAGAAGAGCGATACGCTGTTAGGACGTTAATAACAAAGGCTGCTGTCAATCAA 7360

TTTTGGACCTGACATAT**TCAATCCAACAAGTCTATTC**CAAGACGGAGTTGTGAGGCAT**TCAACGGACTTTCTTCTGAAGT** 7440
AAAACCTGGACTGTATAAGTTAGGTTGTTTCAGATAAGTTCTGCCTCAACACTCCGTAAGTTGCCTGAAGAAGACTTCA 7440

ATGCGCTCGATATAGATTTAATAGACCCAACAGATTACGCCATTTTACGGGATGAGCTGTTTGGCACTGGCCGCATCGAA 7520
TACGCGAGCTATATCTAAATATCTGGGTTGTCTAATGCGGTAATAATGCCCTACTCGACAAACGGTGACCGGCTAGCTT 7520

ATAAAACATAGCTACCCA**ACTCGGATCTATCGGTTTTG**ACGTCGGTTGACCCGATCGATGGAAGCCTTGT**TTATAAAAA** 7600
TATTTTGTATCGATGTGGTTGAGCCTAGATAGCCAAAAC**CTGCAGCCA**ACTGGGCTAGCTACCTTCGGAACAAATATTTTT 7600

CATAGCTGGCGATGAAGTCCATCTAAGCTTTGTCGCCACTGACCTTTTCGTAATCTACAAAAAGTTTTTGT**CATTTACG** 7680
GTATCGACCGCTACTTACAGTAGATTGAAACAGCGGTGACTGGGAAAGCATTTAGATGTTTTTCAAAAACAGTAAATGC 7680

CGGGCGCTCTTAGCGAAGCGCATGATGGGATCAATGGCAGTTTAGTGGGGCACAACAGCATCGTAAGCCTGTTGGCGCGA 7760
GGCCGCGAGAATCGCTTCGCGTACTACCTAGTTACCGTCAAATCACCCGCTGTGTCGTAGCATTCGGACAACCGCGCT 7760

TTTATGGCCGACAACAGCGCGGTGTAGATCCCGCGCTTTCGCAGAAGCTGCACAACATCTTTTCAACCAACTCAAGGA 7840
AAATACCGGCTGTTGTCGCCGCCACATCTAGGGCGGCGAAGCGTCTTCGACGTGTTGTAGAAAAGTTGGTTGAGTTCCT 7840

AGGTTT**CAGCCATCCAAATTTG**AGGCGCTTT**CAAGGCGGGGCTT**GTGCTCAATTTGGCTCCGCCATCGGTGACGCGC 7920
TCCAAAGTCGGTAGGTTTAA**AACTCCG**CAGAAAGTTCCGCCCGGAACAACAGGTTAAACCGAGGCGGTAGCCACTGCGGC 7920

CAGAA**TTGTTGA**ATGCGGCTTACGAGCCATTTATTTATGGATTCCAGACAGGCGATTGGTCCAAACTGGGTGAGACAGT 8000
GTCTTAA**CAACT**TACGCCGAATGCTCGGTAAATAAATACCTAAGGCTGTCCGCTAACCAAGGTTTGACCCACTCTGTAC 8000

TTCGAGTTCCGGTCTCAGTTCTGCGATTGGCTCCTTTGTGGTTGGAGCCGGCCGCTCGGAGTTGGCATCACGCTTGGAA 8080
 AAGCTCAAGCCAGAGTCAAGACGCTAACCCGAGGAAACACCAACCTCGGCGCCGGCAGCCTCAACCGTAGTGCGAACCTTG 8080
 GACTGCAGCCGAGATATTCGCAGTTGGCGTGGTCGCGGTTGGCATAAGCGACGGCATAAATGCTGCTTTAAGCCTAGCGT 8160
 CTGACGTCGGCTCTATAAGCGTCAACCGCACCAGCGCAACCGTATTCGCTGCCGTATTTACGACGAAATTCGGATCGCA 8160
 CCAAGATATTCGATGATCTGACTGAGGCTATTTCAGCCTCAAGAGCAGCCAGCCAACAGCTATTGGATGACCTTCTTATC 8240
 GGTTCATAAGCTACTAGACTGACTCCGATAAGTCGGAGTTCTCGTCGGGTCGGTTGTCGATAACCTACTGGAAGAATAG 8240
 AGGAGATTGCTGGGGATCTCTACGATCAAGACAATCCAAATTTCCAACCTCAAAGACGTTTTGAGGCAACTGGTTACTCT 8320
 TCCTCTAACGACCCCTAGAGATGCTAGTTCTGTAGTTTAAAGGTTGAGTTCTGCAAAACTCCGTTGACCAATGAGA 8320
 CGCGTCTGCAGAAGGACCTGATTTCCGATTGACCGGTCCTTTCCGGTCTTATGACGCTGAACATGCTACGCTCATAATAG 8400
 GCGCAGACGCTCTTCCGACTAAAGGTAACCTGGCCAGGAAAGCCAGGAATACTGCGACTTGTACGATGCGAGTATTATC 8400
 GGACGGCAAATAGCGATAGGATTACGTCAACGGACGATAACGATGTTATTTTTAGCGGTGCTGGAGATGATGTAGTCACA 8480
 CCTGCCGTTTTATCGCTATCCTAATGCAGTTGCTGCTATTGCTACAATAAAAATCGCCACGACCTCTACTACATCAGTGT 8480
 GCGCGCGGAGGTAAGGATATTGTTCTCGGAGGAGCAGGTTCCGATATATTCAGTACTCTGTAACAGAGGGGACAGAGGA 8560
 CGCGCGCTCCATTCTATAACAAGAGCCTCCTCGTCCAAGGCTATATAAGTACTGAGACATTGCTCTCCCTGTCTCCT 8560
 CGGTGCAAGCAACGAAGACGATATCTATGTAGGTAGCGAAGCCTTCGGGATGTTTTCTCAGAACTTTCACAATTGGCTTT 8640
 GCCAGCTTCGTTGCTTCTGCTATAGATACATCCATCGCTTCGGAAGCCCTACAAAGAGTCTTGAAAGTGTAAACCGAAA 8640
 CAGGCGGTGGCAGACTGACATTTGACGTTACACGGTCGATTCCCTCGTTGCAGATGATCCAGAGACGCCCGACGATGAA 8720
 GTCGCCACCGCTCTGACTGTAACATGCAATGTGCCAGCTAAGGAGCAACGCTACTAGGTCCTGCGGGCTGCTACTT 8720
 GGCAGATTGCAGCAGGAGGGCCTTCGAGTAACGGAGCTTAGCCTCTCAAATATCCACACAATTCAAACGGTCGCTATTAC 8800
 CCGTCTAACGTCGTCCTCCCGCAAGCTCATTGCTCGAATCGGAGAGTTTATAGGTGTGTTAAGTTTGCAGCGGATAATG 8800
 CGTTGAAGATCGGGCAAAGGCAATGTGCTACGGATCAGCTCATTTGGGATCGAGAAGGTCGAGTTGTCTGGCCGACCGG 8880
 GCAACTTCTAGCCGTTTTCCGTTACGACGATGCCTAGTCGAGTAACCTAGCTCTTCCAGCTCAACAGACCGGCTGGCC 8880
 ACGAGTTAATCGTTAAAGATCATTCTCTGTGATGTCGCAATCCTGATAGATATGGGTAAGTCTGGCCGGATCGAAAGCGAG 8960
 TGCTCAATTAGCAATTTCTAGTAAGAGAACTACAGCGTTAGGACTATCTATACCATTTCAGACCGGCCCTAGCTTTCGTC 8960
 CTCGCCGTGGGAGAGCGGTTAACTTCTGACGCATTACGATTAAGGTGGACGTCGTAGATTACTCCGGTCTCTCGCATGG 9040
 GAGGGCCAGCCTCTCCGCAATTGAAGACTGCGTAAGTGTAAATTCACCTGCAGCATCTAATGAGGCCAGAGAGCGTACC 9040
 CATCAACTATCTGAATGGCGTGACCTCTGACCACAACGACGTCGACACGCTCGACAACATCTTTCAGTGGCAGGGCTACG 9120
 GTAGTTGATAGACTTACCGCACTGGAGACTGGTGTGCTGCGAGCTGTGCGAGCTGTTGTAGAAAGTCCCGTCCCGATGC 9120
 ATCAGGAACTCTTGACCATTTGCGACTATGCCGCAAGGGAGCGCTTGGTTACAACAACGCGCTACATGTTCAAGGCGCC 9200
 TAGTCTTGAGAACTGGTAACAGCTGATACGGCGGTTCCCTCGGAACCAATGTTGTTGCGCGATGTACAAGTCCGCGG 9200
 GATCAGGTCAAGCTCAGCGATCATGACGACGCTGCTGATCAGTCCGACTTCGGCTCGATCATCACTACTGGCGAGGGCCA 9280
 CTAGTCCAGTTCGAGTCGCTAGTACTGCTGCACGACTAGTCACGGCTGAAGCCGAGCTAGTAGTGATGACCGCTCCCGGT 9280
 GGACAAGATCTGGTTCCACCAACGGAATTGGCGTAACGACCTCAGCAGCGAAGACCGCATTGCTCTTGGCGGTGTGCTGA 9360
 CCTGTTCTAGACCAAGTGGTTGCCTTAACCGCATTGTCTGGAGTCTGCTGCTTCTGGCGTAACGAGAACCGCCACAGACT 9360
 CGCTTACGGTGGATTGAAGAACAAGCATCCGAAGACCCTATGCTTGGGGACCCTATGGGACGCTCTATGGCTCAAT 9440
 GCGAAATGCCACCTAACTTCTTGCTTCTGCTAGGCTTCTGGGGATACGAACCCCTGGGATACCCCTGCAGGATACCGGAGTTA 9440
 GCTGAGGGCAGCTCGTCATCCGCAACGCGTTCTGGCATGTGGCCAATCCGGACGGCAGCCGTCGGACGACGTCGCGAC 9520
 CGACTCCCGCTCGAGCAGTAGGCGTTGCGCAAGACCGTACACCGGTTAGGCCTGCCGTGCGGCAGCCTGCTGCAGCGCTG 9520
 GATGTATGCTCTCAACTGGAAGGACAGGACGACCCAAGGCCAGGGCGGAGGGCGAGGTTGGGGCCGGGCGGGATCTTCC 9600
 CTACATACAGGAGTTGACCTTCTGTCTGCTGGGTTCCGGGTCGCGCTCCCGCTCCACCCGGCCCGCCCTAGAAGG 9600
 TTGCCGAATACCACATGCTTTTTGTCCGCTTTTCGTGACATTACGCTCGATATGAAGGGGAGTATTCCTGTGCTCGGCGAG 9680
 AACGGCTTATGGTGTACAGAAAACAGGCGAAAGCACTGTAATGCGAGCTATACTTCCCGCTCATAAGGCACGAGCCGCTC 9680

Capítulo 4.2. Análisis predictivo de la región secuenciada

GGCGCATTCGATATTCTCGGGCTGATGATCAAGACGATGACGGGTATTATCCCTGGGGCGGACAGGACCCTCTCGTCTCT 9760
CCGCGTAAGCTATAAGAGCCCGACTACTAGTTCTGCTACTGCCCAGTAATAGGGACCCCGCCTGTCTGGGAGAGCAGGA 9760

CGACCTCGATGGCGACGGCATCGAGCTCACGGCGCTTGATCGCTCCAAGTCCAAGCTCGACCTCGACAACGACCTCTACA 9840
GCTGGAGTACCCTGCCGTAGCTCGAGTGCCGGAAC TAGCGAGGTTAGGTTTCGAGCTGGAGCTGTTGCTGGAGATGT 9840

CGGAAGTCTCTGGCTTCGTTGGCAAGGACGACGGCGTTCTCGTCCGCGACTTGAACGGTGTGGCAAAATCACCGGTTCC 9920
CGCTTCAGAGACCGAAGCAACCGTTCTGCTGCCGCAAGAGCAGGCGTGAAC TTGCCACTACCGTTTTAGTGGCCAAGG 9920

GACGAGATGTTTCGGCAATGCCACGACTTCGGGCTCGCCACACTCGCCCTCCTCGACGGCAATCACGACGGCAAGGTCTGA 10000
CTGCTCTACAAGCCGTTACGGTGTGAAGCCCGAGCGGTGTGAGCGGGAGGAGCTGCCGTTAGTGTGCCGTTCCAGCT 10000

TGCCCGCGATAGCGGGCTCGCAGACTTCAACGGTGTGGTGGGTTACCGCGCCGACAGCTTCTCTCACTTCTCGTCT 10080
ACGGCGGCTATCGCCGAGCGTCTGAAGTTGCCACTACCACGCCAATGGCGCCGGCTGTGCAAGAGGAGTGAAGAGCAGA 10080

GGCAAGATGCCAACGAGAACCACCGCACCGATGCTGGTGAACCAAGAGTGTCTGATAGAGCGTGGCATTGCTCGATCAAC 10160
CCGTTCTACGGTGTCTTGGTGGCGTGGCTACGACCATTGAGTTCTCACAGCATCTCGCACCGTAACGGAGCTAGTTG 10160

GTGACGCCAACACCGGAACGGTGCCTCAAGTTCGTTCAATGGCAACACAATCGCCAGCACCGCAGGCTATACGCTCGTGA 10240
CACTGCGGGTGTGGCTTGCCACGGGTTTACGAGTTACCGTTGTGTTAGCGGTCGTGGCGTCCGATATGCGAGCGACT 10240

CGGTACGGTTCGACGATCGCAGACTGCTGCTCAAATCGACAACAGAACACCACTATGTGGTGTCCGATCCAGG 10320
GCCATGCCAAGCGTGTAGCGTCTGCACGACGAGTTTGTAGCTGTTGGTCTTGTGGTGGATACAGCCACGAGGCTAGGTCC 10320

TCTCCAGTTCGGTTCGCTGACCTTGCCGACCTTAGGGGGCGTGGCACGCTCGTATCCCTGCATGAGGGCATGAGCGTTCTT 10400
AGAGGGTCAGCCAGCAGCTGGAACGGCTGGAATCCCCCGCACCGTGCAGCAGTATAGGACGTAAGTCCGCTACTCGCAAGAA 10400

CGGGTGTGAGACGGCGGTTCCGCGTTCGATTTCAGACGCTGACCTCGCCGGTCTATCGGACTTGGCGGAGGCGATCCG 10480
GGCCGACGACTCTGCCGCAAGCGCGACGCTAAGTCTGCGACTGGAGCGGCCAGGATAGCCTGAACGCGCTCCGCTAGGC 10480

GCCGATCTGACGGCATGGGCTCAAGGCTCTCCGGTCAAGATTGGTGTGATATCATCACAGGTGCCGCGGGCTGACCG 10560
CGGCTAGGACTGCCGTACCCGAGTTCCGAGAGGCCAGTTCTAACCCAGACTATAGTAGTCCACGGCGCCCGGACTGGC 10560

CGTATGACGACCTTTCGATCGTTTCGAAAGACGGCGATGTCGTCGATTACGCCTGGGGCGTTTCTCTCCGGTTCGCGG 10640
GCATACTGCTGGAACGCTAGCAAGCGTTTCTGCCGCTACAGCAGCTAATGCCGACCCCGCAAAGGAGGAGGCCACTGCCG 10640

ACGTCCGACATTCGGGGCATCCGGATGGCTCCGGGGTTCATCGTCTCGAGCAGTGGGGTGCCTCGGGACCGCGGAGCT 10720
TGCAGGCTGTAAGGCCGTAGGCTACCGGAGGCCAGTAGCAGAGCTCGTCACTCCACGCAGCCCTGCCCGCTCGA 10720

CACCGTCTCTGTGCGAATGGACGGGTGGCGGCTCATCGATTGTTGTCACGACCGGAACGGAATGCATAACGGCGTTG 10800
GTGGCCAGAGGACAGCGTTACCTGCCACCGCCGAGTAGCTAACAAACAGTGTGGCCTTGCTTACGATATTGCCCAAC 10800

CGGTATCCTATCTCGATTACCGCGACGGTGCAGACTACCTGCGCATCTACAATTACCAGAAGGCCGACTGGAGCAGCAAT 10880
GCCATAGGATAGAGCTAATGGCGCTGCCACTGCTGATGGACGCTAGATGTTAATGGTCTTCCGGCTGACCTCGTCTGTTA 10880

CTTGGCTCGTCCGCCAATCACACGCTCGGCAGCGGCTGCTCATCGACAGATCGCAGGCTCGGACTTCTCTTCTATGA 10960
GAACGCAGCAGCCGTTAGTGTGCGAGCCGTCGCCGACGAGTGTGCTAGCGTCCGAGCCTGAAGAGGAAGATACT 10960

ACGGTTGATCGGTGAATCGCTGCAGGCGTTCTTCGATGTTCCGGACTCCGCCCGCGCGGCTACCAGGCGGTTCGCGGCT 11040
TGCCAAC TAGCCACTTAGCGAGCTCCGCAAGAAGCTACAAGGCTGAGGCGCGCGGCGGATGGTCCGCCAGCGCCGGA 11040

TCCTCGACAAGATGGATGATGCCCTCAACCTCTTTGCGGTTCCGCTGGCGGTGCAAAGCGGTCCCCTTGGCATTATTTT 11120
AGGAGCTGTTCTACCTACTACGGGAGTTGGAGAAACGCCAAGCGGACCGCCAGTTTCGCCAGGGGAACGCGTAATAAAG 11120

GATAGCATCGACTACAATGCCAAAGCGACGGCTTACGTCGAAGAGCGGCTCGCAGATTGCCGCTGTCTTACCAGCGCT 11200
CTATCGTAGTGTGTTACGGTTTCGCTGCCGAAGTGCAGCTTCTCGCCGAGCGTCTAACGGCGACAGAAGTGGCGCGA 11200

TCTTCCGACGCGGCAAGCAAGCAGCGACGCGGTGCTGTTGCTTACCGACTGGAAGCCCTTCTTCGATGTTTTCTGTCCG 11280
AGAACGGCTGCGGCTCGTTTCGCTGCTGCCGACAGCACCGAATGGCTGACCTTCGGGAAGAAGCTACAAAAGGACAGGC 11280

ATTATTCCTGGATCGGCATCGCAGAAGAATACCTATGCATTCTGGCGCAGAACATGCTCAACCGGTTGAGCAGAAT 11360
TAATAAGGACCTAGCCGTAGCGTCTTCTTATGGATACGTAAGGACCGGCTTGTACGAGTTGCGCCAACCTCGTCTTA 11360

GCCGGCGCATTTCCGGTCGCTCGACTTCGCGCATGCTTTCGGCATGGCGCAGGATCTGTTCTTTACTGGGACGGGCGAGGT	11440
CGGCCGCCGTAAGCCAGCAGCTGAAGCGCGTACGAAAGCCGTACCGCGTCTTAGACAAGAAATGACCCTGCCCGCTCCA	11440
CAATGGCAGCGGTCCAGGATGACATCCATGATCGTATGGCGGCGAGACCGTCTCGCGGGCGCACAGGTTCCGATAGCT	11520
GTTACCGTCGCCAGTCTACTGTAGGACTAGCAGCTACCGCCGCTCTGGCAGCAAGCGCCGCTGTCCAAGGTATCGA	11520
ATATCATCGGCAAGAGCTTCGGCTCGACCGAGATCTTCGACGACGATGGCCTCGGGCGCAGCGTCGACACGATCCGCTTC	11600
TATAGTAGCCGTTCTCGAAGCCGAGCTGGCTCTAGAAGCTGTGCTACCGGAGCCGCGTCGCAGCTGTGCTAGGCGAAG	11600
TCGGCACATAATGCCGGCGACATCATCGCCTCGCGGATGGCATCGACCTGCTTCTGACCGATAAAGGTACCGGTGCGGT	11680
AGCCGTGTATTACGGCCGCTGTAGTAGCGGAGCGGCTACCGTAGCTGGACGAAGACTGGCTATTCGGATGGCCACGCCA	11680
GCTACGCATCACCACAGGTTTGAAGGACGCTGGCCCGGCTCGATGATCGGGCAGCGCTCGCGGATTACGGCGTCAACC	11760
CGATGCGTAGTGGTTGCTCAAGCTTCCTGCGACCGGGCCGAGCTACTAGCCGCTGCGCAGCGGCTAATGCCGAGTTGG	11760
AGATCGTCTTCAAGGATGGCACCGTCTGGACAAGGTGGACATCGCCGAAGCCGTTTCAAGATTGACGATGCCTCGACC	11840
TCTAGCAGAAGTTCCTACCGTGGCAGACCTGTTCCACCTGTAGCGGCTTCGGCAAAGCTTCTAACTGCTACGGAGCTGG	11840
CACGTCGTCGGTACCGAGGACATCGATGTCCTGCAGGGTGGTAAGGGAGATGACCTGCTCGAGGGCGGCGGTGATACCGA	11920
GTGCAGCAGCCATGGCTCCTGTAGCTACAGGACGTCACCACCTTCCTCTACTGGACGAGCTCCGCGCCACTATGGCT	11920
TATTTACCGCTACGGTCGTGGCGACGGCAGGATACGATCCACGACTTCGAGGGCAATGCCTTCCGCAATGACCAGGACA	12000
ATAAATGGCGATGCCAGCACCGCTGCCCGTCTATGTAGGTGCTGAAGCTCCCGTTACGGAAGGCGTTACTGGTCTCTGT	12000
TGCTTCAGTTCTCGGACGGCATCCGCAGCGATGACCTGATCTTCCAGCGCGATGGCGCATCGAATGATCTCGTCATCCGC	12080
ACGAAGTCAAGGACCTGCCGTAGGCGTCGCTACTGGACTAGAAGTTCGCGCTACCGCGTAGCTTACTAGAGCAGTAGGGC	12080
TTCAAGAACAGTCCGCTCGACCAGATTACCATCCGAGGACAATTCGCTGCGACTTATACCGGTCCATATGGCACCTGGTA	12160
AAGTTCTTGTGACGGCGAGCTGGTCTAATGGTAGGCTCCTGTTAAGCGACGCTGAATATGGCCAGGTATACCGTGGACCAT	12160
CATGAACCGCATCGACCTGTTACGTTTCGATGACGGCAGCAGCCTGACAAGCGATCAGGTCCGACGATCGTGTGCAAG	12240
GTACTTGGCGTAGCTGGACAAGTGCAAGCTACTGCCGTCGTCGGACTGTTTCGCTAGTCCAGCGGTCGTAGCACACGTTTC	12240
CCCATTCAACTGACGGAAATGATGAGCTCTATGGCATGGAGCGCGAAGACATCTTCGCGGCTGGCAAGGGTACGACTTC	12320
GGGTAAGTTGACTGCCCTTACTACTCGAGATACCGTACCTCGCGCTTCTGTAGGACGCCGACCGTTCCCACTGCTGAAG	12320
ATCTCCGGCGGAAATCAGAACGATCTCTATCTCTATGCGCTTGGGGACGGTCACGACGTCATTCAGGATCGAATGACCAA	12400
TAGAGGCCCGCTTAGTCTTGCTAGAGATAGAGATACCGAACCCTGCCAGTGTGCAGTAAGTCTTAGCTTACTGGTT	12400
CATCCTGTCCGGTACCGATGACTTTCGCGATTTGGAGCAGGTATCGACCGTGAGGATATTACTTTCGGCAGAGTGGATG	12480
GTAGGACAGGCCATGGCTACTGAAAGACGCTAAACCTCGTCCATAGCTGGCACTCCTATAATGAAAGCGGCTCTCACCTAC	12480
GCGACCGCCATTCAATCGTTATCTACGTCAATGGTGGCGAGGGAAGCATACCCTTCAGAACGAGTTCGCCTACGCCGCA	12560
CGCTGGCGGTAAGTTAGCAATAGATGCAGTTACCACCCTCCCTTCGCTAGTGGGAAGTCTTGCTCAAGCGGATGCGGCGT	12560
TCTGGTGTCTTTGGAGATATCTTCTTCGACCGTATCGAGCGCATCGACTTCACGTCCGGGTGATCAGAGCATCGCTGGTA	12640
AGACCACAGAAACCTCTATAGAAGAAGCTGGCATAGCTCGCGTAGCTGAAGTGCAGCCCACTAGTCTCGTAGCGGACCAT	12640
CCAGATCGCGACTACGGTCATTGCTGGGCAGAAGACAGATGGGGCCGACGTCATCGAAGGCTTCGATATCGATGACGTGC	12720
GGTCTAGCGCTGATGCCAGTAACGACCCGCTTCTGTCTACCCCGGCTGCAGTAGCTTCCGAAGCTATAGCTACTGCACG	12720
TTGACGGTGGGGCCGGCAACGACACACTTTACGGCTACAACGGCAACGACACCTACGTGTGGGGCCGGCTATGGCAAT	12800
AACTGCCACCCCGCCGTTGCTGTGTGAAATGCCGATGTTGCCGTTGCTGTGGATGCACACCCCGCGCGGATACCGTTA	12800
GACCAGATCCAGGAGCGAGGCGCCGGCGCATTGAATGGCGGCGATTACGACAAGATCATCTTCCATGATTACGTCAGCGC	12880
CTGGTCTAGGTCCTCGTCCGCGGCGGTAACCTACCAGCGCTAATGCTGTTCTAGTAGAAGGTACTAATGCAGTCCGG	12880
CGATGACATTGCTCTTTCACGGACGCCTGGAGCTAGCGATATCATCATAACGCTGAAGGATACGGGCGAGACTCTGACTC	12960
GCTACTGTAACAGGAAAGTGCCCTGCGGACCTCGATCGCTATAGTAGTATTGGACTTCCCTATGCCCGCTCTGAGACTGAG	12960
TCATTGAGCAAGTATCTTATAACGCCATCAACTACCGCCCGATCAGGTCGACGAAATCCACTTCTCGGATGGCGTAATA	13040
AGTAACCTCGTTCATAGAATATTGGCGTAGTTGATGGCGGGCTAGTCCAGCTGCTTTAGGTGAAGAGCTACCGCATTA	13040

TGGTACGCGTCCGATATCCGGGCCACTACCTGCTCGACGCCAAGACTGACGGCGACGCCACATCTATGGGTTCTGGAC 13120
ACCATGCGCAGGCTATAGGCCCGGGTGATGGACGAGCTGCGGTTCTGACTGCCGCTGCTGGTGTAGATACCCAAGACCTG 13120

GAACAATACGCTCGACGGGGTGCCGGCAACGACATCCCTCGAGGGCGGCACGGTTCCGACACCTATGTCTTCGGCTACG 13200
CTTGTTATGCGAGCTGCCCCACGGCCGTTGCTGTAGGAGCTCCCGCCGCTGCCAAGGCTGTGGATACAGAAGCCGATGC 13200

GCTACGGTCAATGACGAGATCCGGGAAAACCTACGGGATCGTTACCTATGATGATGACGATGCGGTTCCGGTTTCCGGCAGGT 13280
CGATGCCAGTACTGCTCTAGGCCCTTTTGTATGCCCTAGCAATGGATACTACTACTGCTACGCCAAGCCAAACGCCGCTCCA 13280

GTGATTTGGACGACGTACCTTCCAGCGGTTCGGGCGAGTACGATTTGCTGATCTCGCTTCCGGCTCGAGCGACACGCT 13360
CAGCTAAACCTGCTGCAAGTGAAGTGCAGCCGCTCATGCTAAACGACTAGAGCGAACGGCCGAGCTCGCTGTGCGA 13360

TCTGATTACCAGCGAATCTATGTTGGTGTCTGGGACATGAACGATGTGAGCGCTTCTTGTTCGCCGACGGCACACAGA 13440
AGACTAATGGTCGCTTAAGATACAACCACAGACCCTGTACTTGTACAGCTCGGAAGAACAAGCGGCTGCCGTGTGCT 13440

TCACCAGAGAACAGATCAGCCAGCGCATGATCGAAGCAGAGACGCTCCGGCGACGACAGGATCAACGGTTTCGAGCTT 13520
AGTGGTCTCTTGTCTAGTCGGTTCGCTACTAGCTTCGTGCTCGTGCAGGCCGCTGCTGTGCTAGTTGCCAAAGCTCGAA 13520

AACGATACGATCAATGGCGGGCGGCAACGACATCAATCGGGCAAGGGCGCAGATTCGATCACCGGTGGCCGAGG 13600
TTGCTATGCTAGTTACCGCCGCGCCGTTGCTGTAGTAGTTACGCCCTTCCCGCTTAAGCTAGTGGCCACCGGCTCC 13600

AAACGACGTCATCGACGGCGGGATGGAGCGACTCCTATTATTACAGCCGTGGCGACGGCAACGATACCATCGTCGATG 13680
TTTGTGTCAGTAGCTGCCCGCCCTACCTCGCTGAGGATAAATAATGTGCGCACCGCTGCCGTTGCTATGGTAGCAGCTAC 13680

GTGACTGGAGCGGTGGTAGCGACCGTCTCTTCTTAAAGATGTAAATTCGAGTGAAGTCTCCCTCGTTCCGAACGGCAAC 13760
CACTGACCTCGCCACCATCGCTGGCAGAGAAGAAATTTCTACATTTAAGCTCACTTCAGAGGGAGCAAGCGTTGCCGTTG 13760

AGCCTTCTGATCGTCATTGCGGAGTCCGCTCCGGGCGTTGGGACGGCGGATCGGTGCTGCTGAAGGACAGGATCGACGG 13840
TCGGAAGACTAGCAGTAACGCCCTCAGGCGAGGCCCGCAACCCCTGCCGCTAGCCACGACGACTTCTGTGCTAGCTGCC 13840

CTTTTACGAGCGCGCATCGAGACGATTTCAATTTGCGGACGGCATCTCCTGGTTCGCGGATGCTTTCGTGCCGATGGTTA 13920
GAAAATGCTCGCCCGTAGCTCTGCTAAAGTAAACGCCCTGCCGTAGAGGACCAGGCCCTACAGAAGCACGGCTACCAAT 13920

TCAATCAACAGGGCAGCCCGGTAACGACACGATCACCGGTTCAACATTTGCCGATACGCTTCCGGGCGGGAAGGGTGAC 14000
AGTTAGTTGTCCCGTGGCGGCCATTGCTGTGCTAGTGGCCAAGTTTGTAAACGGCTATGCGAACGCCCGCCCTTCCACTG 14000

GACACCATTAACGGCGGGCGGCTATGATACCTATGTCTATGCCGTTGGTACGGTAATGACACGATGTTTCGACGGCGA 14080
CTGTGGTAATGGCCGCCGCCGATACCTATGGATACAGATACGGGCACCCTGCCATTAAGTGTGCTACAAGCTGCCGCT 14080

CTGGAGTGGCAACGGCGACCCGCTGCTGTTTCGTCGATATCAATCCGGGAACATATCGCTCCTTCGCCATGGTAAACGCC 14160
GACCTCACCGTTGCCGTTGGCGGACGACAAGCAGCTATAGTTAGGCCCTTGTATAGCGAGGAAGCGGTACCATTGTGCG 14160

TCAAGATCCTGATGCTGAAACTGCGCCTGGAGCAGGCGATGGCGGTTTCGATCCTGTTCCAGGACACTGTCGACGGCTTT 14240
AGTTCTAGGACTAACGACTTTGACCGGACCTCGTCCGCTACCCCAAGCTAGGACAAGGTCCTGTGACAGCTGCCGAAA 14240

TACGAAAAGGGCTTCGAGACCATTCACTTTGCCAATGGCAGGTTTCGACCAACGACCAGGTGCGCCAGATGCTAGTGG 14320
ATGCTTTTCCCGAAGCTCTGGTAAGTCAAACGGTTACCGTGCCAGACCTGGTTGCTGGTCCACGCGGCTACGATCACCT 14320

TCAAGCGACCACCGCCGCAACGACACGATCACCGGCACTGGACGGGGCGATACCCTGCGCGGTAGCGCCGGTGACGATA 14400
AGTTCCGTTGGTGGCGCCGTTGCTGTGCTAGTGGCCGTGACCTGCCCGCTATGGGACGCGCCATCGCGGCCACTGCTAT 14400

CGTTGAACGGCGGGCGGGCGGCGACGCTATGCTATGCCCGCGGTGACGGCAGCGACAGATGTTTCGACGGCGACTGG 14480
GCAACTTGCCCGCCGCGCCGCTGCGGATACAGATACGGGCGCCACTGCCGCTGCTGTGCTACAAGCTGCCGCTGACC 14480

AGTGGCAACGGCGACAGATCCGTTTCGTCGACGTCAATCCCAATGAGGTAACGCTCGCTCGACAGGGCAACGATCTGAA 14560
TCACCGTTGCCGCTGGTCTAGGCAAAGCAGCTGCAGTTAGGGTTACTCCATTGCGAGCGAGCTGTCCCGTTGCTAGACTT 14560

GATCCTGATCCGAGAAAGTGTTCGGGGGGCGGGCAGCGGTTTCGATCCTGTTCCAGGATACCGTCAACGGCTTTTACG 14640
CTAGGACTAGGCTCTTTTACAACGCCCGCCGCTGCCGCCAAGCTAGGACAAGGTCCTATGGCAGTTGCCGAAAATGC 14640

AAAAAGGCTTCGAGACCATTGCTTTTGGCAATGGCAGCATCTGGACCAATGACCAGGTTCCGCCAGATGCTGATGGATCAG 14720
TTTTTCCGAAGCTCTGGTAAGCGAAACGGTTACCGTGTAGACCTGGTTACTGGTCCAAGCGGCTACGACTACCTAGTC 14720

GCAGCGACCGCCGGCAACGATACGATCAACGGTTCGGACAGGGCCGATATCCTGCAAGGCGACGCTGGAGACGATACGAT 14800
CGTCGCTGGCGCCGTTGCTATGCTAGTTGCCAAGCCTGTCCCGGCTATAGGACGTTCCGCTGCGACCTCTGCTATGCTA 14800

CACCGCCGCGCGGCAGCGACCTCTACGTCTGGCGGCACGGCGATGGCAGCGACACAATCATCGAAGGAGATTGGTCTG 14880
GTGGCCGCGCGCCGCTCGCTGGAGATGCAGACCCGCGTGCCGCTACCGTCTGTTAGTAGCTTCCCTAACCCAGAC 14880

GCACCGCGACCGCCTCCAGCTTTCGGACGTCAACGCACAAGACGTACCTATCTTCGCAATGGCAACGATATCGTCACT 14960
CGTGGCCGCTGGCGGAGGTCGAAAGGCTGCAGTTGCGTGTTCGAGTGGATAGAAGCGTTACCGTTGCTATAGCAGTAG 14960

ATCATCCGCGAAAGCGCGCCTGGCGCGGGCGATGGCAGCTCAATTCGCTGCCCTATTTCTGGATGGCTATTACGAGCG 15040
TAGTAGGCGCTTTCGCGCGGACCGCGCCGCTACCGTCGAGTTAAAGCGACGGGATAAAGGACCTACCGATAATGCTCGC 15040

CGGCGTCGAGAGTGTCTTTTCGAGACGGCAGCATCTACCCCGCGCGAAATCTTGCCGCTGCTGCCGATCATTACAG 15120
GCCGAGCTCTACAAGAAAAGCGTCTGCCGCTAGATGTGGCGCGGCTTAGAACGGCGACGACGGCTAGTAAGTCC 15120

CAACGGCCGGCAACGACAGCATCGACGGCTCGAACGGCGACGATACCTTCGAGGGAGGCTTGGAACGATGTGCTGAAC 15200
GTTGCCGGCCGTTGCTGCTGAGTGCAGGCTGCGGCTGCTATGGAAGCTCCCTCCGGAACCGTTGCTACACGACTG 15200

GGTCTTGGTGGCAACGACACCTACCGCTACTCGCGTGGCGACGGTGGCGATACGGTGATCGAGGGCAGCGCTGGCGGCGC 15280
CCAGAACCACCGTTGCTGTGGATGGCGATGAGCGCACCGCTGCCACGGCTATGCCACTAGCTCCGTCGCGACCGCCGG 15280

CGATGACCGGCTGGTGTTCACCAACATCAATTCACCGAGGTCTCGCTGTCGGCAATGGCACCGATCTGACCATCACGA 15360
GCTACTGGCCGACCAACAAGTGGTTGTAGTTAAGGTGGCTCCAGAGCGACAGCGGTTACCGTGGCTAGACTGTTAGTGT 15360

TCCCGAAAAGCACCCCGACCGTGAATGACCGCGGAAGCGTGTCTTTCGCGCGCTGCGCTGGATGGCGACCAAGGGGGTGC 15440
AGGGCTTTTCGTTGGGCTGGCACTTACTGCGCCCTTCGCACGAAGACCGCGACGCGACCTACCGCTGGTTCACCCACAG 15440

GAAACGGTCTCTTCGCGGATGGCGTGGAGTGGACGAAAACGATATCAGGGTGAAGTTGCTCGGCGCCGTCAGCACAA 15520
CTTTGCCAGCAGAAGCGGCTACCGCAGCTCACCTGCTTTTTGCTATAGTCCCACTTCAACGAGCCGCGCGAGTGTGTTG 15520

CGGCAATGATACCATCACCGGCTTCAGCAGCGGCGACGTTATTACCGGGGGCTCGGAAACGACACGATCAACGGCGCCG 15600
GCCGTTACTATGGTAGTGGCCGAAGTCTGCGCGCTGCAATAATGGCCCCGGAGCCTTTGCTGTGCTAGTTGCCGCGGC 15600

GGGCAATGACGCTACCATTATGCGCGCGGCGACGGGAACGACGTCATACCGAAGCGGTCGCGAATGGCATGGCCGAC 15680
CCCCGTTACTGCAGATGGTAATACGCGCGCCGCTGCCCTTGTGTCAGTAGTGGCTTCGCCAGCGCTTACCGTACCGGCTG 15680

ACGCTTGCCTTCAACGGGATCTTCGCGAGCGACGTTAGTGGGGCCGAGTGGGACCGATCTCGTCTGACGATCGCTCC 15760
TGCGAACGGAAGTTGCCCTAGAAGCGCTCGCTGCAATCGACCCCGCGCTCACCTGGCTAGAGCAGGACTGCTAGCGAGG 15760

GAGTGTGCGCGCGGAACCGACGGTTCGACGATTACTCTGAAGGGCGCGCTGGATGCGAATGCCGAGCAGGGGATCGAGC 15840
CTCACAGCGGCGCCTTGGCTGCCAAGCTGCTAATGAGACTTCCCGCGGACCTACGCTTACGCTCGTCCCTAGCTCG 15840

GGTTTGTATTTGCTGACGGAACGGTCTGGACGTTCTGTCGATTTTCGCGCGCAGGTCGTCACGTTGGCTGGCACGACGGCG 15920
CCAAACATAAACGACTGCCTTGCCAGACCTGCAAGCAGCTAAAGCGGCGGCTCCAGCAGTTGCACCGACCGTGTGCCG 15920

GCGGAAACGGTGAATGGCACCAACGGTTCGACATCATTCGCGCAAACGCCGCGACGACGTCATCAACGGTGGCGGGG 16000
CGCCTTTGCCACTTACCGTGGTTGCCAAGGCTGTAGTAAGCGCGTTTTGCGGCGGTCGCTGCAGTAGTTGCCACCGCCCC 16000

GAGCGATGTCTACCTCTACAGCGCGGAGACGGCAACGACACGATCAACGATGACGCCAATGGCGGTTCAAATGACCGCT 16080
CTCGCTACAGATGGAGATGGTCCGCTCTGCCGTTGCTGTGCTAGTTGCTACTGCGGTTACCGCCAAGTTTACTGGCGA 16080

TGGTCTTGGCGATATCAACCCCGCGCGGTTTCACTTGTCCGCAACGGTATCGATGTGTGCTTGTATCGCACCGACG 16160
ACCAGGAACGGCTATAGTTGGGGCGCCGCAAGTGAACAGCGGTTGCCATAGCTACACAGCGAACAGTAGCGTGGCTGC 16160

GTGGCAGGTGGCGCGGATGGTGAACCATCCTCATCAAGAACGAACCTGACGAAATATTACGCGCGCGGCTTGGACAGGT 16240
CACCGTCCACCGCGCTACACCTTGGTAGGAGTAGTTCTTGGCTGAGCTGCTTATAATGCGCGCGCCGGAACCTGTTCA 16240

CGTCTTTGGCGATGGCACAGTGTGGTCGAGAGCGGACCTGCGGACAATGGTCTGTCAGCAAGCCGGCACCGCGGCAACG 16320
GCAGAAACGGCTACCGTGTCAACACGCTCTCGCCTGGACGCTGTTACCAAGACGTCGTTCCGCGGTTGGCGGCGGTTGC 16320

ACGTCATCGACGGCTTCAATATCGCGGATACGATTAGGGGCGGCAAGGCGACGACACCCCTGAACGGCAAGGCGAGTAAC 16400
TGCAGTAGCTGCCAAGTTATAGCGCTATGCTAATCCCGCGGTTTTCCGCTGCTGTGGACTTGGCGGTTCCGCTCATTG 16400

Capítulo 4.2. Análisis predictivo de la región secuenciada

GACACCTACCTATACGCCCGTGGCGATGGGAACGACACGATCACCGACTACGAAAATGCCGGCGACGATGATCGTCTGGT 16480
CTGTGGATGGATATGCGGGCACCGCTACCCCTTGCTGTGCTAGTGGCTGATGCTTTTACGGCCGCTGCTACTAGCAGACCA 16480

CTTAAACAACATCAATGCGAGCGACGTGACCCCTGGTGGCAGCTGGCATCGACCTGAAGCTGGTGGTTCGCTGAGAGTGCCG 16560
GAAATTGTGTAGTTACGCTCGCTGCACTGGGACCACGCGTGACCGTAGCTGGACTTCGACCACCAGCGACTCTCACGGC 16560

CCGGTGTGCGGCGACGCCGGTTCGATCGTCTCAAGAACATGCTGGACGACTACTATGCGCGCGCGCTCGACAAGGTGGT 16640
GGCCACAGCCGCTGCGGCCAGCTAGCAGGAGTCTTGTACGACCTGCTGATGATACGCGCGCCGAGCTGTTCACCAG 16640

TTGCGGATGGAACGGCTGGACACGGCGGATTTCCGAACCAAGGTCCTGCAGCAGGCTTCAACTGATGGCAATGATAT 16720
AAACGCCTACCTTGCCGGACCTGTGCCCGCCTAAAGGCTTGGTTCAGGACGCTGCTCCGAAGTTGACTACCGTTACTATA 16720

AATCGACGGCTTCAATGTTGCCGATACAATTCGTGGCGCAAGGGCAACGACAGCCTGAACGGCCAGGGCAACAACGACA 16800
TTAGCTGCCGAAGTTACAACGGCTATGTTAAGCACCGCCGTTCCGTTGCTGTGCGACTTGCCGGTCCCGTTGTTGCTGT 16800

CTTACATCTACGCCCGCAGCGACGGCAACGACCTGATCACCGAATGGGACAGCGCGGGCAGCAGCATCGCTGGTATTT 16880
GAATGTAGATGCGGGCGTTCGCTGCCGTTGCTGGACTAGTGGCTTACCCTGTGCGGGCCGCTGCTGCTAGCGGACCATAAA 16880

TCTGACATCAATGCAAGCGACGTCACGCTGGTGGCCTCCGGCATCGACCTGAAGCTGATGGTTCGCCGACGTCGGCGACGG 16960
AGACTGTAGTTACGTTGCTGCACTGCGACCCACGCGAGCCGCTAGCTGGACTTCGACTACCAGCGGCTGCAGCCGCTGCC 16960

GGGGTCGATCCTGCTGAAGAACATGCTGGACGAGTACTATGCGCGTGGTGTGCGACAAGGTTGTGTTTGGCCGACGGCACA 17040
CCCCAGTAGGACGACTTCTTGTACGACCTGCTCATGATACGCGCACCACAGCTGTTCCAACACAAAACGGCTGCCGTGCT 17040

TCTTAACGCGGGCCGACTTCAGGACGACGGTCTGCAGCAGGCTTCAACTGATGGCAATGATATAAATCGACGGCTTCAAT 17120
AGAATTGCGCCCGGCTGAAGTCTGCTGCCAGGACGCTGCTCCGAAGTTGACTACCGTTACTATATATAGCTGCCGAAGTTA 17120

GTTGCCGATACAATTCGTGGCGGCAAGGGCAACGACAGCCTGAACGGCCAGGGCAACAACGACACTTACATCTAGCCCG 17200
CAACGGCTATGTTAAGCACCGCCGTTCCGTTGCTGTGCGACTTGCCGGTCCCGTTGTTGCTGTGAATGTAGATGCGGGC 17200

CAGCGACGGCAACGACCTGATCACCGAATGGGACAGCGCGGGCAGCAGCATCGCTGGTATTTTCTGACATCAATGCAA 17280
GTGCTGCCGTTGCTGGACTAGTGGCTTACCCTGTGCGGGCCGCTGCTGCTAGCGGACCATAAAAGACTGTAGTTACGTT 17280

GCGACGTCACGCTGGTGGCTCCGGCATCGACCTGAAGCTGATGGTTCGCCGACGTCGGCGACGGGGGTCGATCCTGCTG 17360
CGCTGCACTGCGACCCACGCGAGCCGCTAGCTGGACTTCGACTACCAGCGGCTGCAGCCGCTGCCCCAGCTAGGACGAC 17360

AAGAACATGCTGGACGAGTACTATGCGCGTGGTGTGCGACAAGGTTGTGTTTGGCCGACGGCAGCATCTTAAACGCGGGCCGA 17440
TTCTTGTACGACCTGCTCATGATACGCGCACCACAGCTGTTCCAACACAAAACGGCTGCCGTTGCTAGAAATTGCGCCCGCT 17440

CTTCAGGACGACGGTCTGCAGCAGGCTGTGACCGACGGCAATGATACGATCGACGGCTTCAATGTGCGCGACACGATCC 17520
GAAGTCTGCTGCCAGGACGCTGCTCCGACACTGGCTGCCGTTACTATGCTAGCTGCCGAAGTTACAGCGGCTGTGCTAGG 17520

GCGGCGGACGGGAGACGACAGTCTCAACGGCCAAGGTAACAACGACTCCTACCTTTACGCTCGCGGCGACGGCAATGAC 17600
CGCCCGCTCCCTCTGCTGTCAGAGTTGCCGGTTCATGTTGCTGAGGATGGAAATGCGAGCGCCGCTGCCGTTACTG 17600

GCGATCACCGAATACGAAAATGCCGGCAGCATGATCGTCTGGTCTTCAACAACATCAATGCGAGCGACGTGACCCCTGGT 17680
CGCTAGTGGCTTATGCTTTTACGGCCGCTGCTACTAGCAGACCAGAAGTTGTTGTAGTTACGCTCGCTGCACTGGGACCA 17680

GCGCACTGGCATCGACCTGAAGCTGGCGGTTCGCTGAGAGTGCCGCCGTTGTCGGCGACGCCGGTTCGATCGTCTCAAGA 17760
CGCGTGACCGTAGCTGGACTTCGACCCGACGCACTCTCACGGCGCCACAGCCGCTGCGGCCAGCTAGCAGGAGTTCT 17760

ACATGCTGGACGACTACTATGCGCGCGGCTCGACAAGGTGGTCTTTGCCGACGGTACGATCTGGACGCGGGCAACGATC 17840
TGTACGACCTGCTGATGATACGCGCGCCGACGCTGTTCCACCAGAAACGGCTGCCATGCTAGACCTGCGCCCGTTGCTAG 17840

CGAACCAAGCTGCTGGCGAGCGGCCACCGACGGCAACAATACGATTGACGGCTTCAATGTTGCCGATACGATCCATGG 17920
GCTTGGTTCGACGACCGGCTCCGCCGTTGGCTGCCGTTGTTATGCTAACTGCCGAAGTTACAACGGCTATGCTAGGTACC 17920

CGGCAAGGGCGACGACAGCCTGAACGGCCAGGGCAACAACGACACTTATGTCTATACCCGCGGTGACGGCAATGACGTGA 18000
GCCGTTCCCGCTGCTGTCGGACTTGCCGGTCCCGTTGTTGCTGTAATACAGATATGGGCGCCACTGCCGTTACTGCACT 18000

TCACCGAATACGAAAATGCGGGCGGTAGCGACCCGCTGGTGTGTTGCCGACGCCAATGCCGCTGATGTGACATTTGGTGCGC 18080
AGTGGCTTATGCTTTTACGCCCGCCATCGCTGGCGGACCACAAACGGCTGCGGTTACGGCGACTACACTGTAACCACGGC 18080

AACGGCAACGACGTGACTGTTCTGGTGGCGGAAAGTGCCGTCGGCGCTGGCAATGCAGGCTCTATTACGCTCAAAGCGTC 18160
TTGCCGTTGCTGCACTGACAAGACCACCGCCTTTCACGGCAGCCGCGACCGTTACGTCCGAGATAATGCGAGTTTCGCAG 18160

CTTGCAGGACTACTATGGACGGCGCTCGACGCGATTGTCTTCGCCGACGGCACTACCTGGTCTCGGGCCGATATGATCG 18240
GAACGTCTGATGATACCTGCGCCGACGTGCGCTAACAGAAGCGGCTGCCGTGATGGACCAGAGCCCAGCTATACTAGC 18240

CACACATCGCTTATGTCGGAGGAGCAGCCGGCAACGAGACGATCAGCGGATCGTCGGACACCGATCAGATTTCGAGCAGGC 18320
GTGTGTAGCGAATACAGCCTCCTCGTGGCCGTTGCTCTGCTAGTCGCTAGCAGCCTGTGGTAGTCTAAGCTCGTCCG 18320

GCCGGTAACGATACGCTGTGCGGTGGCGCAGGAAACGACACCTACTTTTATTTCGGCCGAGACGGCAACGACATCCTCGA 18400
CGGCCATTGCTATGCGAACAGCCACCGCTCCTTTGCTGTGGATGAAAATAAGCCGGCTCTGCCGTTGCTGTAGGAGCT 18400

TGAGCAGACGTCGGGGACGGATGTCGATGTTCTTCGCCTTCATGATCTACTGAAGAGCGAAGTGCGGTTCGAGAGATCTG 18480
ACTCGTCTGCAGCCCTGCCTACAGCTACAAGAAGCGGAAGTACTAGATGACTTCTCGCTTCACGCCAAGCTCTCTAGAC 18480

CATCGGCGCCGAATGACGTCTATGATCCGCGTCTTGCACCCGGCGAGGGATAACACTGAAGAACCAGTTCAACCTGGCC 18560
GTAGCCGCGGCTTACTGCACTACTAGGCGCAGGAACGGTGGCCGCTCCGCTATTGTGACTTCTTGGTCAAGTTGGACCGG 18560

GGCGCGTTGAATCGATTGTCTTCAAGGATGGTGAGGTTCTTGGGGGTGCCGCGGTGCACTCGACACTGCGCTCAGGAG 18640
CCGCGCAACTTAGCTAACAGAAGTCTTACCCTCAAGAACCCCCAGGGCGCCACGTGAGCTGTGACGCGAGTCTCTC 18640

TCTTGTGGCGATCTACGGCACGGCGGGCAACGATACGCTGGTCGGCACAGTCGACAACGACACCTTCATCGGGGGAGCG 18720
AGAACACCGCTAGATGCCGTGCCGCCGTTGCTATGCGACCAGCCGTGTCAGCTGTTGCTGTGGAAGTAGCCGCCCTCGC 18720

GCGACGACCGTTACAACAGCGGTACCGGCAGCGATATCTATCTCTATGCCAAGGGGGGGCGCAGCGACTATATCGACGAC 18800
CGTGTGCGCAATGTTGTCGCCATGGCCGTGCTATAGATAGAGATACGGTTCCCCCGCGTCGCTGATATAGCTGCTG 18800

CAGTCGAGCTCGACGGTCGATGTCGAGCTCCTGCGCTTCAGCGACCTAGATGCGGGTGACGTTACGTTTCAGCCGGTCAGG 18880
GTCAGCTCGAGCTGCCAGCTACAGCTGCAGGACGCGAAGTGCCTGGATCTACGCCCACTGCAATGCAAGTCCGCCAGTCC 18880

AGTTTACACACTGATCACGGTCAATGAGACGGGGCAGTCTACCCCTCGACGAGCAGCTTTCCTCGACGACCGCAACT 18960
TCAAGTGTGACTAGTGCCAGTTACTCTGCCCCGTCAGTAGTGGAGCTGCTCGTCGAAAGGAGCTGCTGGCGGTTGA 18960

GGGACTGGAGCGAATCGAGTTTTCGGACGGCACGGTCTGGAATCGCGCGCAGATATCGTCCGCATCGTGGATCCGCGGG 19040
CCCCGACCTCGCTTAGCTCAAACGCCTGCCGTGCCAGACCTTAGCGCGCTTATAGCAGGCGTAGCACCTAGGCGCCC 19040

ACGGCCGGGAACGATACGCTGACCGGCACCACCGGCAATGACACACTTATGGCGGAGCCGGCAATGACACGCTCAATGG 19120
TGCCGGCCCTTGCTATGCGACTGGCCGTGGTGGCCGTTACTGTGTGAAATACCGCCTCGCCGTTACTGTGCGAGTTACC 19120

TGGCGACGGAAGCGATATCCATTTTCGGCGGCGACGGTGTATGATCTTCTGATTTGGCAACGTCGGCGCAGACAGCTTCGATG 19200
ACCGTGCCTTCGCTATAGGTAAGCCGCGCTGCCACTACTAGAAGACTAACCGTTGCAGCCGCTGCTGTGCAAGCTAC 19200

GCGGCAACGGCGTTGATACCTTAGACTTCACCTACTATACGGGCGCCAGCCAGTGTGATCTTTTCAGCAGGCGTCGTC 19280
CGCCGTTGCCCAACTATGGGATCTGAAGTGGATGATATGCCCGGGTCCGTCGACTAACTAGAAAGTCTGCCGACGAG 19280

ACTTTCACCGACAACAGCACCACCGAGCAGATCCTGAACATCGAGAATGTGATAGGGGGCTCAGGTGTTAATGATATCCG 19360
TGAAAGTGGCTGTTGTCGTGGTGGCTCGTCTAGGACTGTAGCTCTTACACTATCCCCGAGTCCACAATTACTATAGGC 19360

CGGGTCATCCGCCGACAACAGGCTTGATGGCGGAGCGGGCAACGACGGGATCTCCGGCAACGACGGCAACGACATCCTGA 19440
GCCCAGTAGGCGGCTGTTGTCCGAATACCGCCTCGCCGTTGCTGCCCTAGAGGCGGTTGCTGCCGTTGCTGTAGGACT 19440

TCGGCGGCGACGGAGACGATACACTTCGGCGGCGCAGCGGCAACGATACGTTGATTGGCGGTACCGGTTTCGACAGCTTC 19520
AGCCGCGCTGCCCTCTGCTATGTGAAGCGCCGCCGTCGCCGTTGCTATGCAACTAACCGCCATGGCCAAAGCTGTGCAAG 19520

GATGGTGGCGATGGTTTCGATACGGGCGACTTCAGTTATTTCGACTGCCGCTGGACATTGGACCTTCAGCAGGGCAAGGC 19600
CTACCACCGCTACCAAAGCTATGCCCGCTGAAGTCAATAAGCTGACGGCGGACCTGTAACTGGAAGTCTGCCGTTCCG 19600

TCTTTCGAGCGGCACCACCGAGACAATGGTGTGATCGAGGCATTGATCGGCGGAGCCGGAACGACATCCTCATTTGGCA 19680
AGAAAGCTCGCGTGGTGGCTCTGTTACCACAGCTAGCTCCGTAACCTAGCCGCTCGGCTTTGCTGTAGGAGTAACCGT 19680

ATGCGGAAGCCAATCGGCTGGAAGGCCGCTCGGCAACGACAGCTCACGGGTGGCGCAGGGGATGATGCCCTTCGTGTTTC 19760
TACGCCCTCGGTTAGCCGACCTTCGGCGGAGCCGTTGCTGTGCGAGTGCCACCGCGTCCGCTACTACGGAAGCACAA 19760

Capítulo 4.2. Análisis predictivo de la región secuenciada

AAAGCCGGGTTTGGTCGTGACACGTTGACTGATTTTACCGCCGGCGCAGCCAGTGTGGATGTGCTCGACATCAGCACGGA 19840
TTTCGGCCCAAACCAGCACTGTGCAACTGACTAAAATGGCGGCCGCTCGGTACACCTACACGAGCTGTAGTCGTGCCT 19840

CCTCTTCAGCGACTTTGCTCTGTGATGGCAGCCGCCAACAGGTCCGGAGCAGACACCGTGATCACCCATGGCGCCAACA 19920
GGAGAAGTCGCTGAAACGGAGACACTACCGTCGGCGGTTGGTCCAGCCTCGTCTGTGGCACTAGTGGTACCAGCGGTTGT 19920

CCTCGATCAGCGTGAAGAAGCTCGCGCTGACAAGCCTGCACCAGGACGATTTCCGCTTACGACCCGGCGCTGACGAAG 20000
GGAGCTAGTCGACTTCTTGCAGCGGACTGTTCCGACGTGGTCTGTAAAGGCGAAGTGTGGCGCCGCACTGCTTCC 20000

GAAAATGCTTTGAACAAGGCTGCAGAACAGCCGTCACAAGTATTCCTTGTGGCGGCCCTCTCGTCGCTTCGCAAGGCTTT 20080
CTTTTACAGAACTGTTCCGACGCTTGTGCGCAGTGTTCATAAGGAACACCGCCGGGAGAGCAGCGAAGCGTTCCGAAA 20080

CCTCGGAGTAGGCTAACAAGCTGTGTCAATATTTCTGGCATTGACGGGCTCATTCTTCATGCTTCAGGTCTACGATC 20160
GGAGCCTCATCCAGATTGTTTCGACACAGTAGTTATAAGACCGTAACTGCCCGAGTAAGAAGTACGAAGTCCAGATGCTAG 20160

GGTTCATTCGGCGCCGACGCTGCCGACATTGGTGGGACTCGGGGTCATTGCCGCGACGCTGTTGCTTTCGAAGGCATT 20240
CCCAGTAAGGGCCGGCGTCGGACGGCTGTAACCACCTGAGCCCCAGTAACGGCGCTGCGACAAGCAGAAGGTTCCGTAA 20240

CTGGAATTGATCAGATCGTTGCTCCTCGTCCGGTCCGGCACCGCGGTCGACGAACGTTTCGGTGACCGCGCTACGGTTC 20320
GACCTTAAGTACTAGCTAGCAACGAGGAGCAGGCCAGCCGTCGGCCAGCTGCTTGCAAAGCCACTGGCGCAGATGCCAAG 20320

CCTGGTCTATTGCCGTGCGCATGTCAGATGCCGGGCGACGGCCTGCAATGCGTGGCGATCTCGATACCGTACGGCGAT 20400
GGACCAGGATAACGGCAGCGCTACGCTACGGCCCGTGCAGGACGTTACGCACGCGCTAGAGCTATGGCATGCGCCTA 20400

TCCTGTCGGGACCGGGCCGACGGCCCTGTTTCGACATGCCGTGGATGCCTTTCTATCTCTTCCTTTGTTTCTCTTCCAC 20480
AGGACAGCCCTGGCCCCGGTGCAGGACAAGCTGTACGGCACCTACGGAAAGATAGAGAAGGAACAAAGGAGAAGGTG 20480

TTCTGGATCGGAGTAACGCGCTGCCGGCGCATTGATGCTCATTGGACTGACGGTGCTGACCGAGTCCGGTCCAGCCA 20560
AAGACCTAGCCTCATTGACGCGAACGGCCGCTAACTACGAGTAACCTGACTGCCACGACTGGCTCCAGGCCAGTGGCGT 20560

GCCGGCAAAGGAAGCAGCCAAGCTGCCGCGAGCGAATCAATCTCGCCGAAGCGACCAAGCGAAACTCGGAAGCTGTCC 20640
CGGCCGTTTCTTCGTCGGTTCGAACGGCGTCTCGCTTAGTTAGAGCGGCTTCGCTGGTTCGCTTTGAGCCTTCGACAGG 20640

TCGCCATGGGCTTCGGCCATTTTCATTGGACTACGTTGGACCGAGATCAACCGAAAATATCTGGCAAACCAGTGGCCGCC 20720
AGCGGTACCCGAAGCCGTAAGTAACCTGATGCAACCTGGCTCTAGTTGGCTTTTATAGACCGTTTGGTGCACCGGCGG 20720

AGCACCGTACCGGTTGGGCTGGCGACCGCTTCGAAAATCCTGGCATGATGCTGCAGTCCGGTGTCTCGCCGTGGCGG 20800
TCGTGGCAGTGGCCACCCGACCGCTGGCGAAGCTTTTAGGACGCTACTACGACGTCAGGCCACAAGAGCGGCAGCCCG 20800

CCTTCTGGTAATCCGGCAGGAGCAAGCGGCGCATCATGATCGCTAGCTCCATTCTGGTGGAGCCGCGCACTCGCACCC 20880
GGAAGACCATTAGCCGCTCCTCCGTTCCGCGCCGCTAGTACTAGCGATCGAGGTAAGACCACTCGCGCGTGAGCGTGGG 20880

TCGAGCTTGCCATTGGGCAATGGAAAGGCTTCGTGGCCGCTCGACAAAGCTGGGCGCGCTGACGAAGCTGATGACGCTG 20960
AGCTCGAACGGTAACCCGTTACCTTTCCGAAGCACCAGGAGCTGTTTCGACCCGCGGACTGCTTCGACTACTGCGAC 20960

ATGTCCTCGGAACAGCGGAGGTCGGCTACCAGCGCGCGGAAAGCCTGACCGTCGAAAACCTGCAGATCGCCGCC 21040
TACAGGAGCCTTGTGCGCTCCAGCGGATGGTCGCGGCGCCCTTTCGGACTGGCAGCTTTTGGACGCTTAGCGGCGGG 21040

CGGTGGCCGAGAACTATTCTCCGCGCGTCTCCTTCAAGGTTTCGGCAGGCGAGGCAAGTGGCGTTCATCGGTCCAAGCG 21120
GCCACCGCGCTTTGATAAGAGGCGCCGAGAGGAAGTCCAAAGCCGTCGCTCCGTCACCCGAGTAGCCAGGTTCCG 21120

CATCGGAAAGTTCGACGCTCGCCCGCGGCTCACAGGCTTTGGCTGCCACTGGGGGCTCAGTGGAGACTCGATCAGGCG 21200
GTAGCCCTTTAGCTGCGAGCGGGCGCGCAGTGTCCGAAACCGACGGTGACCCCCGAGTCACTCTGAGCTAGTCCGC 21200

TTGCTCAGCAATGGGACCCACGCAACTCGGCGCTCATGTGCGCTACCTGCCGAAGATGTCTCGCTCTTTGATGGCTC 21280
AACGAGTGCCTTACCCTGGTGCCTTGTAGCCGGCAGTACAGCCGATGGACGGCGTCTACAGAGCGAGAACTACCGAG 21280

TATTGCTCAAACATAGGGCGATTTCGATCCAGATGCCGGATCCGAGGCGATCATCGCTGCAGCGCGCGAGCCGTTT 21360
ATAACGAGTTTTGTATCCCGCTAAGCTAGGCTACGGCCTAGGCTCCGCTAGTAGCGACGTCGCGCGCTCGGCCACAAA 21360

ACGAGATGATCGTGCAGTTTCTGATGGATTTCGACACGAAGATTGGAGAGCATGGATCGCGCTCTCGGCTGGCCAGCG 21440
TGCTCTACTAGCAGCTCAAAGGACTACCTAAGCTGTGCTTCTAACCTCTGTAACCTAGCCGCGAGAGCCGACCGGTCGCG 21440

CAGCGTATAGCGCTAGCGGGGCGCTCTATGGTGATCCTTTCCTGGTGGTTCTCGACGAGCCAACTCTAACCTCGACGC 21520
 GTCGCATATCGCGATCGCGCCCGCGAGATACCACTAGGAAAGGACCACCAAGAGCTGCTCGGTTTGAGATTGGAGCTGCG 21520

CGACGGGGAGCGCGCTGACAAGAGCAATCTCTGGCGTTTCGCTCGAGAGGAGGGATTGCAATCGTGATTGCGCATCGGC 21600
 GCTGCCCTCCGCCGCGACTGTCTCGTTAGAGACCGCAAGCGAGCTCTCTCCCTAACGTTAGACTAACCGGTAGCCG 21600

CGAGCGCCTTGGTCGCCGTCGACAAGATCTTGGTCATGGGTAACGGCCAGATGCAGGCTTTCGGTCCCAAGGACGAAGTG 21680
 GCTCGGGAAACCAGCGCGAGCTGTTCTAGAACAGTACCCATTGCCGGTCTACGTCCGAAAGCCAGGGTTCTGCTTCAC 21680

CTGAGCAAGACAACGGCACGGCCGCCAAAGTCCGCGCCTCAACCCGTCGGTCTGCTGATTGGTGGCAGGAGACCGGATC 21760
 GACTCGTTCTGTGCCGTGCCGGCGGTTTCAGGCGCGGAGTTGGGCAGGACGACTAACCCCGCTCCTCTGGCCTAG 21760

rzcE ->
 GTGAGAGAGAAGGGAGCGCCATCGGCCGAGCGGCCATCCGCAATCTAACCGTGGCTGCCCTGGCACCATTCTGCTCCT 21840
 CACTCTCTCTCCCTCGCGGTAGCCGGCTCGCGCGGTAGCGGTTAGATTGGCACCGAGCGGAAACCGTGGTAAGACGAGGA 21840

CGGCGCGGTTCATGGGAGGTCTTGCAGCGACCACCCGCTCTCAGGCGCGGTCAATTGCATCGGGAACGGTAGTCGTCGACA 21920
 GCCGCCGAGTACCCTCCAGAACGTCGCTGGTGGGCGGAGATCCGCGGCAAGTAGCCCTTGCCATCAGCAGCTGT 21920

GCTATGTGAAGCCGGTCCAGCACCCAGAAAGGTGGAACGGTTCGGCCAAATCTTCGTCAAGGACGGCGATCTGGTGAAGCC 22000
 CGATACACTTCGGCCAGGTCGTGGTCTTCCACCTTCCAGCCGGTTTAGAAGCAGTTCCTGCCGCTAGACCAACTTCGG 22000

GGCCAAGTCTTATTATCTCGACGACACGCAGACGGCGCCAACTTCGCCATTGTTCAGAAAACGTCCTCGACGAGCTTTC 22080
 CCGGTTCAAGATAAGTAGAGCTGCTGTGCGTCTGCGCGGTTAGAGCGGTAACAGCTTTTGCAGAGCTGTCGAAAG 22080

GGCCAGAACCGCACGGCTTGAAGCGGAACGGGATGGTGGCGGTACGGTCGAGTTTTTCGAAAGATTTTCTTGCAAAAGCCA 22160
 CCGGTCCTGGCGTGCCGAACCTCGCCTTGCCTACCACGCGGATGCCAGCTCAAAGCTTCTAAAAGAAGCTTTTCGGT 22160

ACGATCCTCAGGTCAGCCGCTCGATTGAAGGAGAGAAGCGGCTCTTCGCCGACAGGAGATCTTCGCGCACGAGCCGTAAG 22240
 TGCTAGGAGTCCAGTCCGCGAGCTAACTTCTCTCTTCGCCGAGAAGCGGCTGCTCTTAGAAGCGGCTGCTCGGCATTC 22240

CGCGAGTTGCGCGAGCAATTGAGCAGCTCAAACAAGAAACGGAAAGGCTGGTCCGCGCAGGAAACAGGAAAACGACAAGA 22320
 CGCGTCAACGCGCTCGCTTAACTCGTCGAGTTTGTCTTTCGCTTCCGACCAGCGGCTCCTTGTCTTTTGTCTGTTCT 22320

AATCGGGCTGATCGAAAAGAGCTGGAAAGCCTCGACGGCTGTTTGTATCAGGGGCTCGTTCAGCCAACAGAGTGTATG 22400
 TTAGCCGACTAGCTTTTTCTCGACCTTTCGGACGTCGCCGACAAACTAGTCCCGAGCAAGGTCGGTGTCTCACATAC 22400

CCCTGCAGCGAGAAGCCGCAACCTGACGGGAGAGCTTGGCAGTCTTCTTGCCAACGAGGCACAGGCGAAGGGCAGAATC 22480
 GGGAGTCGCTCTTCGGCGCTTGGACTGCCCTCTCGAACCGTCAGAAGAAGGTTGCTCCGTGTCGGCTTCCGCTTAG 22480

ACTGAGACGGAGCTTCAGATCATCCAGATCGATGACGACCTGCGTAGCGAGGTGTCGACCAGCTTCGTCAGGCCGAGAG 22560
 TGACTTGCCTCGAAGTCTAGTAGGCTAGCTACTGCTGGACGCATCGCTCCACAGGCTGGTCGAAGCAGTCCGGCTCTC 22560

CGATATCGGCGAGTTTTCCGAACGTCCTCGTCGCGCCGAGGATGACCTGCAACGCATCGATATTCGTGCGTTCGAGGGTG 22640
 GCTATAGCCGCTCAAAGGCTTGCAGAGCAGCGGGGCTCCTACTGGACGTTGCGTAGCTATAAGCACGCGAGCTCCAC 22640

GCGTCGTGCATCAGCTTTCGGTTACGCACCCGGCGCCGTCATTGCTCCGGGAGATGCGATCATGCAGATCGTTCAGAT 22720
 CGCAGCAGTAGTCGAACGGCAAGTGCCTGGGCGCGGCAAGTAAACGAGGCCCTTACGCTAGTACGCTAGCAAGGCTTA 22720

CGTGATGCCCTCGTTGCGAGGGTGAAGCTTTCGCCAACTGACATCGACCAGGTCACCATGGACAGACGGTGCATCTGAG 22800
 GCACTACGGGAGCAACGCTCCACTTCGAAAGCGGTTGACTGTAGCTGGTCCAGTGGTAACCTGTCTGCCACGTAGACTC 22800

ATTTTCCGCTTCACTCAGAGAAACACCCGGAGCTGAATGGCGTCTGGCCGGCATCGCGGGACCTGACGGCGGATC 22880
 TAAAAGGCGGAAGTGAAGTCTCTTTGTGGGCTCGACTTACCGCAGCACCGGCCGTAGCGCCGCTGGACTGCCGCTTAG 22880

AACGCTCGGGTCTCAGTACTATGTCTGTTGCTGAGGTTTCCGATGGCAGTGGCTGAGGCTTGGTCAAGTACGCCT 22960
 TTGGGAGCCAGAGTCGATGATACAGCAAGCAGACTCCAAAGGCTACCGCTACCGACTCCGAACAGTTCAGTGCAGG 22960

CTTCCGGCATGCCGTTGAAGCCTTCATACAGACCGCGGAGCGGACTGCTCTGGCCTATCTGACAAAGCCCTTCATGGA 23040
 GAAGGGCCGTACGGCCAACTTCGGAAGTATGTCTGGCCGCTCGCCTGACGAGACCGGATAGACTGTTTCGGGAAGTACCT 23040

rzcF ->
 TCAGGTCGCGGAGCCTTAAGGAAGATTAGGGGAGATGCAACACTTTGATGAAAGATCGGGGGAGGAAAGACTCCAGAC 23120
 AGTCCAGCGGCTCGGAAATTCCTTCTAATCCCTCTACGTTGTGAAACTACTTTCTAGCCCCCTCCTTCTGAGGCTG 23120

Capítulo 4.2. Análisis predictivo de la región secuenciada

CACTTCGGACTCGGTAGCCCGTTCAACATTCCTGCGGCTGCGTATCCCGTCCGAGCGATGCCAGGATCTCGGTCAGC 23200
GTGAAGCCTGAGCCATCGGGCAAAGTTGTAAGGGACGCCGACGCATAGGGCCAGGCTCGCTACGGGTCTAGAGCCAGTGC 23200

GTGCAGGTC AAGCGAAAAGGCCGTTTATCTTTCTGACGAGCTTCGAGGACTGGCTGCGCTATCGGTCTGTTCTTCAT 23280
CACGTCCAGTTCGCTTTTCCGGCAAATAGAAAGACCTGCTCGAAGCTCCTGACCGACGCGATAGCCAGCAAGAGAACGTA 23280

GCCAGCCAGATATTCAGCTTTCCGGTTAACTCCCACTCCTATTTGGCCGTGGATTTCTTCTTTTGCCTAAGTGGTTTCGT 23360
CGGTGCGTCTATAAGTCGAAAGCCGAATTGAGGGTGAGGATAAACCGGCACCTAAAGAAGAAAACGGATTACACCAAGCA 23360

CCTCGCGAATGGGTACGACCAAACCTCTGAAGTCGGGCGCTCTGGGAGCAAGGCATTCTCTGAAGCGCGTCTGCGGC 23440
GGAGCGCTTACCCATGCTGGTTTGTAGACTTCAGCCCGGAGACCCCTCGTTCGTAAGAAGGACTTCGCGCAGCAGCGC 23440

TTTATCCGATGATAGTGGTGGTGTGCGCCTGGGCGTCATCGCGTCGCAAGTTGCTTTGACGCCACGTATTGCTCTCGT 23520
AAATAGGCTACTATCACCAACCACAGCCGGACCCGAGTAGCGCAGCGTTCAACGAACTGCGGTGCATAACGAGAGCGA 23520

GACGTCTCGATTCTGTGTGGGCGCACTAATCCTATTGCCCTTAGGGCTTCTGGTGGGGCAGGAGGCCCTTCGCGATCAA 23600
CTGCAGAGCTAAGAACGACACCCCGCTGATTAGGATAACGGGAATCCCGAAGACCACCCCGCTCCTCCGGAAGCGTAGTT 23600

CAACCCACTCTGGTCCATCTGCTTTGAAATGGTCGCTAGCGTAGCCTACGGATGCATTGCTCGCCGAAGATTTCACTTTT 23680
GTTGGGTGAGACCAGGTAGACGAACTTTACCAGCGATCGCATCGGATGCCTACGTAACGAGCGGCTTCTAAAGTAAAA 23680

GGTATGAGATAGCGGCAATCGCATTATTGGCGGACGCGTTTTTCAAGTGTCAATGTTGGAGGTGGCATCGGGCCGTT 23760
CCATACTCTATCGCCGTAGCGTAATAACCGCGTCGCGAAAAAGTTCAACAGTACAACCTCCACCGTAGCCCGGCCAA 23760

GGATTGCGGAGCTGGCGAGCGTTCCCTTGAAGGCTTTATCAGGGTCGGCTTTTCTCTCCTTGGCGGCTCTGATCTTCCG 23840
CCTAAGCGCTCGACCCTCGCAAGGAACTTCCGAAATAGTCCCAGCCGAAAAGGAAGAACGGCCGAGAACTAGAAGGC 23840

CTGGAGAATCTACCAACGTGTTGGGGCGGCTCCACCTCAGATCCCGTTTTCTGCTCTGATCGCCGTTCTAATTCCCCCT 23920
GACCTCTTAGATGGTTGACAAACCCCGCGAGGTGGAGTCTAGGGCGAAAAGCAGGACTAGCGGCAAGATTAAGGGGGGA 23920

TTTCCGTCGCAATGACATTTACGATTTCAATTTGCATCGCGGTGATAATTCACATCGTGGTTCGCGCTAGCGGCAGCAGTA 24000
AAAGGCAGGGCTTACTGTAAATGCTAAAGTAAACGTAGCGCCAGTATTAAGGGTAGCACCAGCGGATCGCCGCTGTCAT 24000

CCGAGGGCGCGGAGCGGCCGTTGCTGCTATCTCGGGCAGTTGCTTTATCCCTGTATGCGGTCCATCTGCTGTGAT 24080
GGCGTCCCGCCTCGCCGCAAGCGACGGATAGAGCCCGTCAACAGAATAGGGGACATACGCCAGGTAGACGGGACACTA 24080

TCAGTTGCGGCGATCATTTCAAAATCTCACCGATGGCTTCATTCCATTGCCGGTCACGGTGGGCGGTACCCCTGCTGGTGC 24160
AGTCAAGCCGCTAGTAAAGGTTTTAGAGTGGCTACCGAAGTAAGGTAACGGCCAGTGCACCCGCCATGGGACGACCAGC 24160

CTGTGCGGCTGGCACATTTTACACGGTGTCTGACGCGCCCTTCGGGCGTACTTGGGCGCAAGTTTCTTTGAA 24240
GACAGCCGACCCGTGTAATAAATGTGCCAACGAAGCTGCGCGGGGAAGCCCGCATGAACCCGGCGTTCAAGGAAACTTA 24240

TAGACGGGCTCACCTCCCAAGCGAGCGGGCGATTTCGATGCCGGATGCCGCTCAAGAGTATTAAGGCGGCGAAAAGCCCC 24320
ATCTGCCCGAGTGGAGGTTTCGCTCGCCGCTAAGCTACGGCTACGGCGCAGTTCTCATAATTCGCGCCCTTTTCGGGG 24320

TGCGCCTTGTGTCGATGTCGCGGACGCGAGGATCCAGTGGCGTTGCCGCTGCGACCTACTCGGCATCCGGCAAGTCCGTG 24400
ACGCGGAACGACAGCTACAGCGGCTGCTCCTAGGTACCCGCAACGGGACGCTGGATGAGCCGTAGGCCGTTTCAGGCAC 24400

TCCGACACGATCAAGGATGCGATCGCAACGTTTCGGCGAGAACATGAACCTGCGCCGTTTCGACCGCTCTCTCGGTGAGGA 24480
AGGCTGTGCTAGTTCTACGCTAGCGTTGCAAGCCGCTCTTGTACTTGGACGCGGCAAGCTGGCGAGAGAGCCAGCTCCT 24480

CGGCGTCTGTCGCCACCTATACCCACGATGCTGTTTCCGACGGCTCGGCAAGCTCGGCGTTCTCGTTGCGCTGAAGTCGA 24560
GCCGACGAGCGGTGGATATGGGTGCTACGACAAAGGCTGCCGGAGCCGTTTCGAGCCGCAAGAGCAACGCGACTTCAGCT 24560

CCGGTGACAAGGAAGCCCTGAACGCCATCGGCCGCTAGGTGCGCATGCACATCGCCGCCACCGCGCCGTTGGCGATCCGC 24640
GGCCACTGTTCTTCGGACTTTCGGTACGCCGCGATCCAGCGGTACGTGTAGCGGGGTGGCGGGCGACCCGCTAGGCG 24640

CCGGAAGAAGTCGATGCCGCGTCCGCGAGCGGAGCGCAACGCTTTCATCGAACAGTCGCGCGCTCCGGCAAGCCGGG 24720
GGCCTTCTCAGTACGGCGGACGCGGCTCGCGCTCGGTTGCAAGAAGTAGCTTGTACGCGCGGAGGCGGTTTCGGCC 24720

CAACATCATCGAAAAGATGGTCAAGGCGCATGCGCAAGTCTTCGAGGAAGTCGCTCTTCTTTCGAGGCTTTTCGTCA 24800
GTTGTAGTAGCTTTTCTACCAGCTTCCGGCGTACGCGTTCAAGAAGCTCCTCAGCGAGAAGAAAGCGTCCGAAAAGCAGT 24800

```

TTAATCCGGATCCGACCGTCGCCGCCGCCATCAAGGAAGCTGAAAAGGCCGTCGGCGCGCCGATCGAAGTTGCCGGCATG 24880
AATTAGGCCTAGGCTGGCAGCGCGGGCGGTAGTTCTTCGACTTTTCCGGCAGCCGCGGGCTAGCTTCAACGGCCGTAC 24880

GCCCCTGCTGCTCGCGAAGGCGTCGTTCCCATCGAAGGAGTTTGAAGGGGGACTCCCGAAAGTGAGTGTGAAAAGGG 24960
CGGGCAGACGACGAGCCGCTTCCGCAGCAAGGGTAGCTTCTCAAACCTCCCCTGAGGGCTTCACTCACACTTTTCCC 24960

TGCTCCGGATCAGGGGCAGACACCCTTTTT 24990
ACGAGGCCTAGTCCCCTGTGTGGGAAAAA 24990

```

Figura 4.12: Secuencias palindrómicas imperfectas encontradas en la región que se encuentra en 5' con respecto al gen *rzcC*. Se muestran el codón de inicio de *rzcC* en color naranja y las secuencias palindrómicas en color verde debajo de la secuencia de nucleótidos. Los fallos en las secuencias palindrómicas se indican mediante la ausencia de subrayado.

```

5' -TATTCACCCCCAGAGAGCATCGCGATGCAATTTCACTTGCAATTGTAAATTC AATTTGTAATCTCCATCCAG
      AGAGAGCATCGCGATGCAATTT
            TGCAATTTCACTTGCAATTGTA
                  ATTGTAAATTC AATTTGTAAT
                                                    rzcC->
CAATCCGAGTTGGGACGATTGCAACTATATCGGGCTATTTTGCCGGTAACCCATGGGGCTGGGGATACATG-3'

```

El primer ORF tiene el codón ATG como posible inicio de traducción, y el codón de terminación es TGA. El contenido en G+C es del 62,33 %, consta de 1176 pb, y codificaría para una proteína de 391 aminoácidos con un peso molecular estimado de 43709,51. Al comparar la secuencia de aminoácidos de este ORF con secuencias de proteínas depositadas en bases de datos con el programa BLASTP se observó similitud con transposasas de diferentes especies bacterianas como *Rhizobium* sp. NGR234 (Tabla 4.3).

Tabla 4.3: Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos del ORF1 con otras secuencias de proteínas depositadas en bases de datos.

Especie bacteriana	Proteína	Nº de aminoácidos	% de identidad	% de similitud	Solapamiento	Nº de acceso
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	Transposasa	392	69	75	410	AAQ87511
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	Transposasa	394	55	67	339	BAB54696
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	Transposasa	397	52	61	390	BAB52729
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	Transposasa putativa Y4qJ	398	54	66	338	AAB92465
<i>Burkholderia fungorum</i> LB400	Proteína hipotética Bcep02007833	361	49	57	358	ZP_00277493
<i>Bergeyella zoohelcum</i>	Transposasa	388	35	51	388	AAA50501
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	Transposasa de la familia IS91 putativa	372	35	51	335	AAN55254 AAN55209 AAN55082 AAN54572 AAN55557
<i>Pirellula</i> sp. 1	Transposasa	375	33	49	396	CAD71822
<i>Pirellula</i> sp. 1	Transposasa putativa y4qj	375	32	48	395	CAD74645 CAD75331 CAD71842
<i>Pirellula</i> sp. 1	Transposasa	375	32	47	395	CAD71828

El segundo ORF se encuentra a 14 nucleótidos del ORF1 en dirección 5'-3'. Tiene un codón ATG como posible inicio de traducción y una secuencia AGGAGA, situada a 6 pb del codón ATG, como posible sitio de unión al ribosoma. El codón de terminación es TGA. El contenido en G+C es de 60,98 %, se compone de 861 pb y codificaría para una proteína de 286 aminoácidos con un peso molecular estimado de 31852,84. La comparación de la secuencia aminoacídica de este ORF con otras secuencias depositadas en bases de datos con el programa BLASTP mostró que guarda similitud con integrasas/ recombinasas de diferentes especies bacterianas como *Rhizobium* sp. NGR234 (Tabla 4.4).

Tabla 4.4: Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos del ORF2 con otras secuencias de proteínas depositadas en bases de datos.

Especie bacteriana	Proteína	Nº de aminoácidos	% de identidad	% de similitud	Solapamiento	Nº de acceso
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	Integrasa/ recombinasa putativa Y4QK	286	85	90	286	AAQ87512
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	Y4qK (Integrasa/ recombinasa putativa)	308	45	62	277	AAB92466
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	Integrasa/ recombinasa	299	45	62	287	BAB54697
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	Integrasa/ recombinasa	302	45	58	293	BAB52730
<i>Burkholderia fungorum</i> LB400	Integrasa	277	46	60	277	ZP_00277494
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	Integrasa/ recombinasa	287	70	77	148	BAB52333
<i>Burkholderia fungorum</i> LB400	Integrasa	252	46	60	246	ZP_00277495
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	Y4eF	251	43	57	235	AAB91651
<i>Burkholderia cepacia</i> R1808	Integrasa	232	43	58	232	ZP_00218967
<i>Pirellula</i> sp. 1	Integrasa/ recombinasa putativa Y4QK	461	35	51	279	CAD75339

El tercer ORF se encuentra a 572 nucleótidos del ORF2 en dirección 5'-3'. Tiene un codón GTG como posible inicio de traducción y una secuencia GAAG, situada a 10 pb del codón GTG, como posible sitio de unión al ribosoma. El codón de terminación es TGA. El contenido en G+C es de 60,16 %, se compone de 384 pb y codificaría para una proteína de 189 aminoácidos con un peso molecular estimado de 13133,73. La comparación de la secuencia aminoacídica de este ORF con otras secuencias depositadas en bases de datos con el programa BLASTP mostró que guarda cierta similitud con la región amino terminal de proteínas histidina quinasa de diferentes géneros bacterianos (Tabla 4.5).

Tabla 4.5: Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos del ORF3 con otras secuencias de proteínas depositadas en bases de datos.

Especie bacteriana	Proteína	Nº de aminoácidos	% de identidad	% de similitud	Solapamiento	Nº de acceso
<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA	Histidina quinasa, sensor/regulador de respuesta	1112	27	41	110	AAR34929
<i>Dechloromonas aromatica</i> RCB	Histidina quinasa de transducción de señal	865	33	52	59	ZP_00152220
<i>Bacillus cereus</i> G9241	Histidina quinasa putativa	417	27	45	62	EAL11745
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	Proteína <i>sensory box</i>	998	32	52	53	AAN54561
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13	YdeD	309	32	44	78	AAU40018
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	<i>Sporulation kinase</i>	417	25	43	62	AAP10462
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> k10	Proteína hipotética MAP3786	480	26	39	116	AAS06336
<i>Halobacterium</i> sp. NRC-1	Vng1681c	279	40	53	65	AAG19930

El cuarto ORF está situado a 631 nucleótidos del ORF3 en dirección 5'-3'. Tiene un codón ATG como posible inicio de traducción y una secuencia GGGGA, situada a 4 pb del codón ATG, como posible sitio de unión al ribosoma. El codón de terminación es TGA. El contenido en G+C es del 54,74 %, está compuesto de 570 pb, y codificaría para una proteína de 189 aminoácidos con un peso molecular estimado de 20434,53. La comparación de la secuencia aminoacídica de este ORF con otras secuencias de proteínas depositadas en bases de datos con el programa BLASTP mostró que guarda la máxima similitud con la proteína aciltransferasa RzcC de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (Tabla 4.6). El ORF4 pasó a denominarse *rzcC* de aquí en adelante.

Tabla 4.6: Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos del ORF4 con otras secuencias de proteínas depositadas en bases de datos. *: Secuencia de aminoácidos incompleta.

Especie bacteriana	Proteína	Nº de aminoácidos	% de identidad	% de similitud	Solapamiento	Nº de acceso
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 162Y10	RzcC	190	78	85	181	AAF36413
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	ApxIIC	159	29	50	99	CAA43422 AAO74634
<i>Actinobacillus suis</i> 3714	ApxIIC	160	29	50	99	AAA21917
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	Blr4093	172	32	49	97	BAC49358
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotipo 5	ApxIIC	159	28	48	99	AAA87231
<i>Mannheimia haemolytica</i>	LktC	148*	34	54	55	AAL12769* AAL12766* AAL12784* AAA25528 AAA25542
		167				
<i>Mannheimia glucosida</i>	LktC	148*	34	54	55	AAL12810* AAL12805*
<i>Mannheimia haemolytica</i>	LktC	147*	34	54	55	AAL12781* AAL12778* AAL12790* AAL12787* AAL12793*
		148*				
<i>Mannheimia varigena</i> 177	LktC	166	34	54	50	AAR09160
<i>Mannheimia ruminalis</i> HPA113	LktC	167	32	54	55	AAR09164

El quinto ORF se encuentra a 501 nucleótidos del gen *rzcC* en dirección 5'-3'. Tiene un codón ATG como posible inicio de traducción y una secuencia GAGG, situada a 8 pb del codón ATG, como posible sitio de unión al ribosoma. El codón de terminación es TGA. El contenido en G+C es del 57,80 % y está compuesto de 13005 pb. Codificaría para una proteína de 4334 aminoácidos con un peso molecular estimado de 457104,41. La comparación de la secuencia aminoacídica de este ORF con otras secuencias depositadas en bases de datos con el programa BLASTP mostró que guarda la máxima similitud con las proteínas RzcA de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* y *Mesorhizobium loti* cepa MAFF303099 (Tabla 4.7). A partir de este momento el ORF5 pasó a denominarse *rzcA*.

Tabla 4.7: Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos del ORF5 con otras secuencias de proteínas depositadas en bases de datos.

Especie bacteriana	Proteína	Nº de aminoácidos	% de identidad	% de similitud	Solapamiento	Nº de acceso
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 162Y10	RzcA	4163	75	80	3669	AAF36415
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	RzcA	1018	51	68	978	BAB48496
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 248	Bacteriocina	958	35	54	925	CAA04800
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Toxina RTX	3209	27	42	1915	ZP_00162014
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	Hemolisina de unión a calcio probable	1943	26	40	2063	AAQ58193
<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c	Bacteriocina	2064	31	44	1152	AAF85206
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 4074	ApxIVA	1805	32	48	705	AAD01698
<i>Xylella fastidiosa</i> Dixon	Toxina RTX	1814	29	43	1015	ZP_00039036
<i>Xylella fastidiosa</i> Temecula1	Proteína de unión a calcio tipo hemolisina	1562	30	44	833	AAO29349
<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000	Hemolisina de unión a calcio putativa	1217	28	42	986	CAD13630

El sexto ORF está situado a 55 nucleótidos del gen *rzcA* en dirección 5'-3'. Tiene un codón GTG como posible inicio de traducción y el codón de terminación es TGA. El contenido en G+C es del 61,13 %, está compuesto de 1716 pb, y codificaría para una proteína de 571 aminoácidos con un peso molecular estimado de 60683,02. La comparación de la secuencia aminoacídica de este ORF con otras secuencias depositadas en bases de datos con el programa BLASTP mostró que guarda la máxima similitud con la proteína RspD de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* y *Mesorhizobium loti* cepa MAFF303099 (Tabla 4.8). El ORF6 recibió el nombre de *rzcD*.

Tabla 4.8: Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos del ORF6 con otras secuencias de proteínas depositadas en bases de datos.

Especie bacteriana	Proteína	Nº de aminoácidos	% de identidad	% de similitud	Solapamiento	Nº de acceso
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 162Y10	RspD	571	92	95	571	AAD34890
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	RspD	581	62	77	570	BAB48495
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	Transportador ABC, familia HlyB/MsbA	582	56	74	564	BAC53179
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	PrsD RspD	615	57	72	557	AAL44196 AAK90007
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	Transportador ABC	617	55	70	554	CAC46614
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	RspD PrsD	583 606	54	72	538	AAL45207 AAK89026
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	PrsD	582	54	70	568	AAB64091 CAC49692
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> TA1	PrsD	570	52	69	547	CAA66799 AAB57756
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 8401	PrsD	570	52	70	547	CAA73292
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	RspD	570	49	67	554	BAB53004

El posible codón de inicio GTG del séptimo ORF está superpuesto con el codón de terminación TGA del ORF6. El codón de terminación es TAG. El contenido en G+C es del 58,89 %, está compuesto de 1311 pb, y codificaría para una proteína de 436 aminoácidos con un peso molecular estimado de 47371,65. La comparación de la secuencia aminoacídica de este ORF con otras secuencias de proteínas depositadas en bases de datos con el programa BLASTP mostró que tiene la máxima similitud con la proteína RspE de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* y *Mesorhizobium loti* cepa MAFF303099 (Tabla 4.9). El ORF7 pasó a llamarse *rzcE*.

Tabla 4.9: Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos del ORF7 con otras secuencias de proteínas depositadas en bases de datos.

Especie bacteriana	Proteína	Nº de aminoácidos	% de identidad	% de similitud	Solapamiento	Nº de acceso
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 162Y10	RspE	436	94	96	436	AAD34891
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	RspE	434	53	67	432	BAB48494
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	RspE	474	54	70	402	AAK90008
	PrsE	437				AAL44195
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	Proteína transmembrana de secreción de toxina putativa	436	52	67	436	CAC46615
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	Proteína de secreción, familia HlyD	456	53	69	401	BAC53178
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	RspE	436	47	66	425	AAK89025
		434				AAL45208
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	PrsE	439	44	60	434	AAB64092 CAC49691
<i>Oligotropha carboxidovorans</i>	RspE	447	47	65	402	CAG28444
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	Proteína de fusión de membrana	376	49	67	376	ZP_00051514
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 8401	PrsE	435	43	62	402	CAA73293

El octavo ORF está situado a 6 nucleótidos del ORF7 en dirección 5'-3'. Tiene un codón ATG como posible inicio de traducción y el codón de terminación es TAG. Tiene dos posibles sitios de unión al ribosoma GGAAGA y AGGGG a 10 pb y a 3 pb del codón ATG respectivamente. El contenido en G+C es del 55,70 %, está compuesto de 1167 pb, y codificaría para una proteína de 388 aminoácidos con un peso molecular estimado de 41967,46. La comparación de la secuencia aminoacídica de este ORF con otras secuencias depositadas en bases de datos con el programa BLASTP reveló que guarda similitud con la proteína RspF de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (75%) y con una proteína aciltransferasa de *Bacteroides thetaiotaomicron* cepa VPI-5482 (40%) (Tabla 4.10). El ORF8 pasó a denominarse *rzcF*.

Tabla 4.10: Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos del ORF8 con otras secuencias de proteínas depositadas en bases de datos. *: Secuencia de aminoácidos incompleta.

Especie bacteriana	Proteína	Nº de aminoácidos	% de identidad	% de similitud	Solapamiento	Nº de acceso
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 162Y10	RspF	388	72	75	388	AAD34892
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482	Aciltransferasa	382	24	40	329	AAO77474
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	Blr2157	405	26	37	332	BAC47422
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	Aciltransferasa putativa	337	28	40	300	AAK23309
<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444	Aciltransferasa predicha	342	26	41	262	ZP_00304912
<i>Cytophaga hutchinsonii</i>	Aciltransferasa predicha	346	28	40	263	ZP_00310496
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	Aciltransferasa putativa	346	27	43	218	BAC49953
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	RspF	372	27	38	310	AAK90259
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> A136	ORF2 en locus <i>picA</i> (<i>picA</i> 5' región)	365				AAL43943
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> A136	ORF2 en locus <i>picA</i> (<i>picA</i> 5' región)	191*	42	51	83	AAA22105*
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	Aciltransferasa	402	25	36	338	BAB54335

En las siguientes tablas (Tabla 4.11 y Tabla 4.12) se muestran algunas características de las proteínas codificadas por los genes anteriores, basándose en los análisis del programa DNASTar.

Tabla 4.11: Número de aminoácidos (aa) totales y de aminoácidos básicos (K, R), ácidos (D, E), hidrofóbicos (A, I, L, F, W, V) y polares (N, C, Q, S, T, Y).

Proteína	Aa totales	Aa básicos	Aa ácidos	Aa hidrofóbicos	Aa polares
Transposasa	391	55	27	143	82
Integrasa	286	39	26	108	66
ORF3	127	7	2	63	21
RzcC	189	18	20	79	41
RzcA	4334	262	680	1538	1128
RzcD	571	56	45	253	108
RzcE	436	52	64	170	92
RzcF	388	25	23	201	68

Tabla 4.12: Peso molecular, punto isoeléctrico y carga a pH 7.

Proteína	P molecular (Da)	pI	Carga a pH 7
Transposasa	43709,51	10,545	31,026
Integrasa	31852,84	10,326	14,343
ORF3	13133,73	10,991	5,406
RzcC	20434,53	6,700	-0,908
RzcA	457104,41	3,846	-409,422
RzcD	60683,02	9,703	11,868
RzcE	47371,65	5,094	-11,173
RzcF	41967,46	8,094	3,272

4.2.2. Análisis predictivo de las proteínas de la región responsable de la expresión de la bacteriocina

Utilizando el programa ClustalX, se realizaron alineamientos de cada una de las proteínas con secuencias de proteínas conocidas depositadas en bases de datos. Las secuencias se seleccionaron en función de los resultados de las comparaciones realizadas anteriormente con el programa BLASTP. También se buscaron dominios conservados mediante el programa RPS-BLAST. Se empleó el programa SOSUI para determinar si se trataban de proteínas solubles o de membrana, y en este último caso conocer el número y posición de las hélices transmembrana predichas. Además se estudio la presencia o ausencia de péptidos señal en las proteínas mediante el programa SOSUI (Signal) y el servidor SignalP 3.0. Asimismo con el programa PSORT se llevó a cabo una predicción de la posible localización subcelular de las proteínas. Por otra parte, se hizo un estudio predictivo de la estructura secundaria consenso de las proteínas, de la presencia de estructuras *coiled-coil* (2 hélices α yuxtapuestas) y de motivos hélice-vuelta-hélice (HTH) mediante el servidor NPS@. También se buscaron cremalleras de leucinas (estructura *coiled-coil* en la que las dos hélices interaccionan entre sí mediante cadenas laterales de leucinas) con el servidor 2ZIP, y repeticiones con el programa Radar (EBI).

4.2.2.1. Análisis de la transposasa

El alineamiento de la transposasa (ORF1) se puede ver en la Figura 4.13.

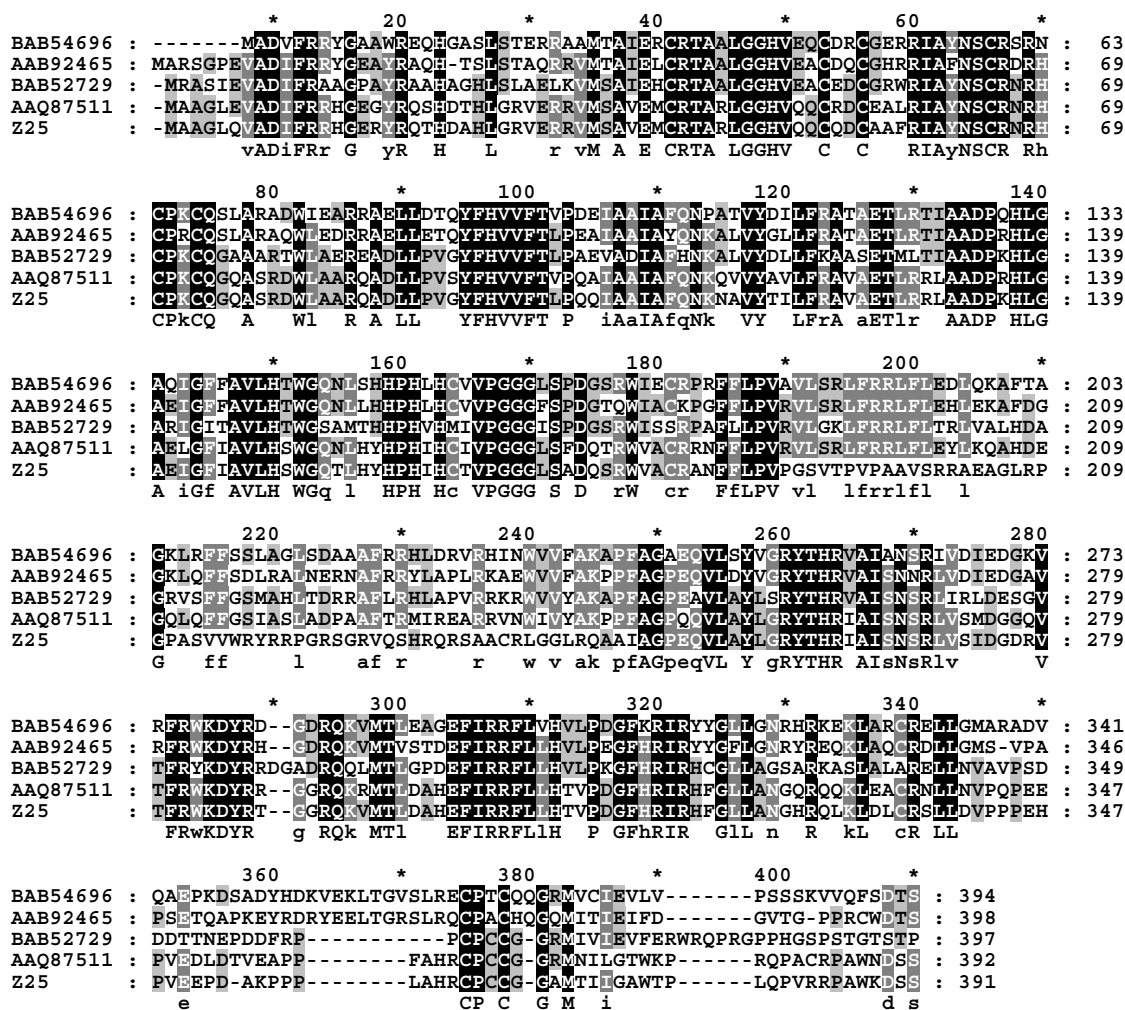


Figura 4.13: Alineamiento del ORF1 con secuencias de proteínas conocidas depositadas en bases de datos. BAB54696: transposasa de *Mesorhizobium loti*, AAB92465: transposasa putativa Y4qJ de *Rhizobium sp. NGR234*, BAB52729: transposasa de *Mesorhizobium loti*, AAQ87511: transposasa de *Rhizobium sp. NGR234*, Z25: transposasa de *Rhizobium leguminosarum Z25*. Sombreado: █ residuo 100% conservado, █ residuo 80% conservado, █ residuo 60% conservado.

La búsqueda de dominios conservados con el programa RPS-BLAST dio como resultado un alineamiento del 100 % con el dominio conservado CDD 26317 pfam04986.5 Transposase_32. El dominio pfam04986.5 está formado por 180

aminoácidos y el alineamiento se produce en la región del ORF1 que abarca los aminoácidos 143-333 con un valor de E de $2e-38$ (Figura 4.14). Este dominio está conservado en transposasas putativas. Las transposasas son necesarias para la correcta transposición de secuencias de inserción o de transposones. Esta familia incluye a las transposasas IS1294 de *Shigella flexneri* (AAK18483) e IS801 de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (P24607), ambas de la familia IS91.

```

1 MAAGLQVADIFRRHGERYRQTHDAHLGRVERRVMSAVEMCRTARLGGHVQ 50
51 QCQDCAAFRIAYNSCRNRHCPKCQGGASRDWLAARQADLLPVGYPFHVVFT 100
101 LPQQIAAIAFQNKNAVYTIIFRAVAETLRRLAADPKHLGAEI GFIAVLHS 150
151 WGQTLHYHPHIHcTVPGGGLSADQSRWVACRANFFLPVPGSVTPVPAAVS 200
201 RRAEAGLRPGPASVWVRYRRPGRSGRVQSHRQRSAACRLGGLRQAAIAGP 250
251 EQVLAYLGRYTHrIAISNSRLVSIDGDRVTFRWKDYRTGGRQKVMTLDAH 300
301 EFIRRFLLHTVPDGFHRIRHFGLLANGHRQLKLDLCRSLLDVPPPEHPVE 350
351 EPDAKPPPLAHRCPCCGGAMTIIIGAWTPLQPVRPAPAWKDSS 391

```

Figura 4.14: Secuencia del ORF1 en la que se indica en rojo la región que alinea con el dominio conservado pfam04986.5. Los residuos subrayados son motivos consenso de la familia IS91 (Mahillon y Chandler, 1998; Tavakoli et al., 2000). En minúscula se indican los residuos que no siguen el consenso. Motivo I: C+.R.CP.C.+ , Motivo II: *(H/N)(P/Q)H*H*...*, Motivo III: Y...Y..K... donde + representa un aminoácido básico, * un aminoácido hidrofóbico, . cualquier aminoácido.

En la Figura 4.15 aparece la estructura secundaria consenso de la transposasa (ORF1).

```

          10          20          30          40          50          60          70
Transposasa MAAGLQVADIFRRHGERYRQTHDAHLGRVERRVMSAVEMCRTARLGGHVQQCQDCAAFRIAYNSCRNRHC
Sec.Cons.   ccchhhhhhhhhhhh?c?hh?hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh?ccccccccchhhh?e?ecccccccc
          80          90          100         110         120         130         140
Transposasa PKCQGGASRDWLAARQADLLPVGYPFHVVFTLPQQIAAIAFQNKNAVYTIIFRAVAETLRRLAADPKHLGA
Sec.Cons.   cccccc?hhhhhhhhhh?ccccccccc?hhhhhhhhhhccchhhhhhhhhhhhhhhhhhh?ccccch
          150         160         170         180         190         200         210
Transposasa EIGFIAVLHWSGQTLHYHPHIHCTVPGGGLSADQSRWVACRANFFLPVPGSVTPVPAAVSRRAEAGLRPG
Sec.Cons.   heeeeeeh?h?cccccccccccccccccccccccc?h?e?hccc?cccccccccccc?hhhhhhhhhhcccc
          220         230         240         250         260         270         280
Transposasa PASVWVRYRRPGRSGRVQSHRQRSAACRLGGLRQAAIAGPEQVLAYLGRYTHRIAISNSRLVSIDGDRVT
Sec.Cons.   cccccccccccccccc??hhhhhhhhhh?hhhhhhhhccchhhhhhhccc?eeeeccccccccccccccc
          290         300         310         320         330         340         350
Transposasa FRWKDYRTGGRQKVMTLDAHEFIRRFLLHTVPDGFHRIRHFGLLANGHRQLKLDLCRSLLDVPPPEHPVE
Sec.Cons.   eeeecccccccccccceeeehhhhhhhhhhhhhhhhhhhhccccccc?eh?hc???chhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhcccccccccc
          360         370         380         390
Transposasa EPDAKPPPLAHRCPCCGGAMTIIIGAWTPLQPVRPAPAWKDSS
Sec.Cons.   cccccccccccccccccccccccceeee?cccccccccccccccccc

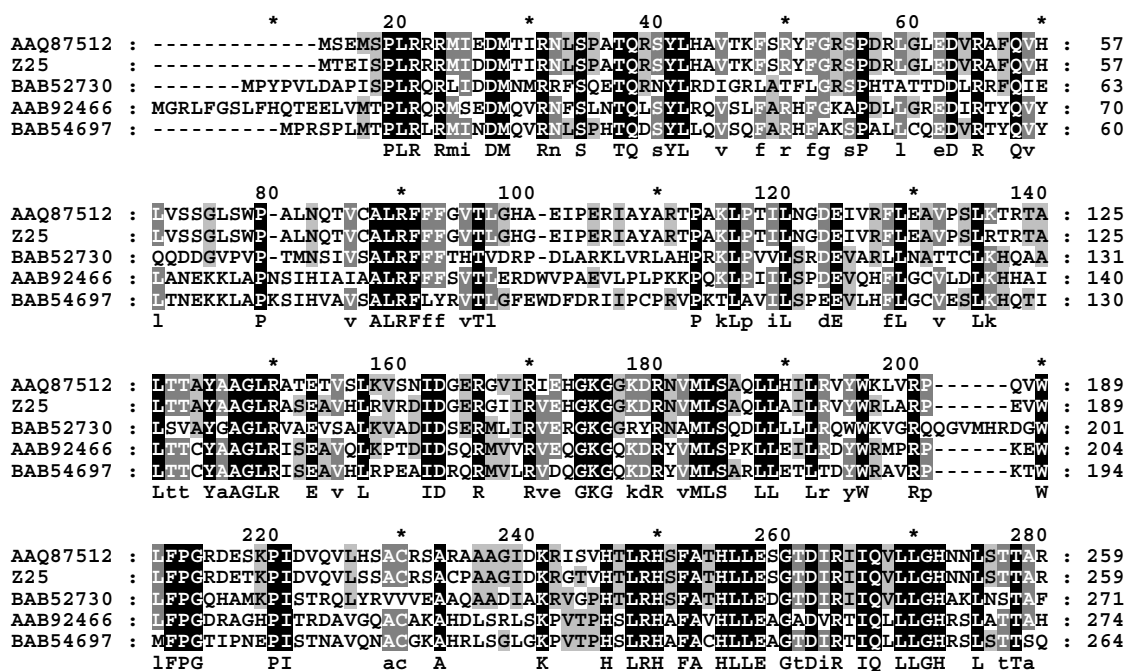
```

Figura 4.15: Estructura secundaria consenso del ORF1. **Hh**: Hélice α , **Ee**: lámina β , **Cc**: random coil (bucle al azar), ?: estados ambiguos.

Según el programa SOSUI la proteína ORF1 es una proteína soluble, y los programas SOSUI (Signal) y SignalP 3.0 coinciden en que no tiene péptido señal. Según PSORT su localización es citoplasmática. No se han encontrado estructuras *coiled-coil*, HTH, cremalleras de leucinas, ni repeticiones.

4.2.2.2. Análisis de la integrasa

El alineamiento de la integrasa (ORF2) se puede ver en la Figura 4.16.




```

          *           300           *
AAQ87512 : YTKVSNLIRATTSPLDRLTL----EVVPTG---- : 286
Z25      : YTKVSNLIRSTTSPLDRLTL----EVVPPG---- : 286
BAB52730 : YTKVATRTVRTVTSPLDKLGLFKPEELSPDG---- : 302
AAB92466 : YLRIATNKVCATSSPFELIPRPAP-TPPPAKPEYF : 308
BAB54697 : YLRIATSKVCAATSPFELIPRPVPKAAPLPPPEHF : 299
          Y           tSP1 L           P

```

Figura 4.16: Alineamiento del ORF2 con secuencias de proteínas conocidas depositadas en bases de datos. AAQ87512: integrasa/recombinasa putativa Y4QK de *Rhizobium* sp. NGR234, Z25: integrasa de *Rhizobium leguminosarum* Z25, BAB52730: integrasa/recombinasa de *Mesorhizobium loti*, AAB92466: Y4qK de *Rhizobium* sp. NGR234, BAB54697: integrasa/recombinasa de *Mesorhizobium loti*. Sombreado: █ residuo 100% conservado, █ residuo 80% conservado, █ residuo 60% conservado.

Al emplear el programa RPS-BLAST se obtuvieron alineamientos con varios dominios conservados. En la Tabla 4.13 se indican los dominios de cada familia que dieron alineamientos con valores más bajos de E. El dominio CDD 27734 cd01193 INT_IntI dio un alineamiento del 100 % y un valor de E de $1e-66$. Este dominio corresponde a los dominios amino y carboxilo terminal de integrasas IntI (E2), tirosina recombinasas específicas de sitio, y enzimas de corte y unión de ADN. Incluye a integrasas que forman parte de integrones multirresistentes, y están presentes en muchos elementos móviles como transposones y plásmidos conjugativos. Se han encontrado super integrones cromosómicos en especies de *Vibrio*, *Shewanella*, *Xanthomonas* y *Pseudomonas*. Portan grandes insertos con la excepción de las proteínas tipo TnpF ermF. El dominio CDD 25561 pfam00589 corresponde al dominio carboxilo terminal de integrasas de fago. Estas integrasas poseen en el extremo carboxilo terminal un residuo de tirosina conservado responsable de la unión covalente de la proteína al ADN tras el corte. El sitio activo de la recombinasa CRE está formado por los residuos Arg-173, His-289, Arg-292 y Tyr-324. El dominio CDD 8420 pfam02899 corresponde al dominio amino terminal de integrasas de fago, que se caracteriza por ser de tipo SAM (*Sterile Alpha Motif*, estructura formada por 5 hélices α con un núcleo hidrofóbico cuya función está relacionada con la formación de oligómeros). El dominio CDD 14105 COG4974 se encuentra en la recombinasa específica de sitio XerD.

cremalleras de leucinas. Con el programa Radar se ha observado la existencia de dos tipos de repeticiones (Tabla 4.14).

Tabla 4.14: Repeticiones encontradas con el programa Radar en el ORF2.

Posición	Repeticiones
42-51	SP.DRLGLEDV
273-283	SPIDRLTLEV
131-141	AAGLRASEAVH
215-225	AAGIDKRGTVH

4.2.2.3. Análisis del ORF3

El alineamiento del ORF3 con la región amino terminal de varias proteínas se puede ver en la Figura 4.18.

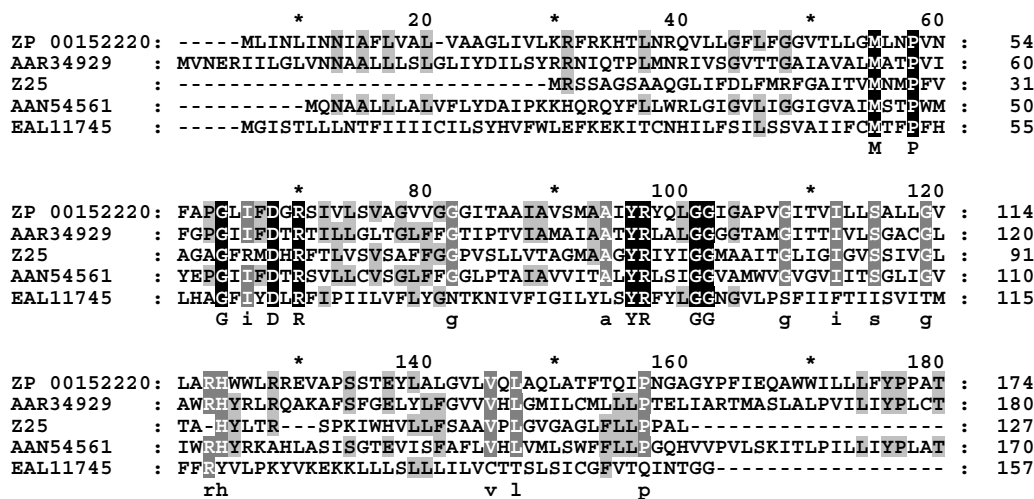


Figura 4.18: Alineamiento del ORF3 con secuencias de proteínas conocidas depositadas en bases de datos. ZP_00152220: Histidina quinasa de *Dechloromonas aromatica* RCB, AAR34929 Histidina quinasa de *Geobacter sulfurreducens* PCA, Z25: ORF3 de *Rhizobium leguminosarum* Z25, AAN54561: Proteína *sensory box* de *Shewanella oneidensis* MR-1, EAL11745: Histidina quinasa putativa de *Bacillus cereus* G9241. Sombreado: ■ residuo 100% conservado, ■ residuo 80% conservado, ■ residuo 60% conservado.

No se han encontrado dominios conservados con el programa RPS-BLAST. En la Figura 4.19 se indica la estructura secundaria consenso del ORF3.

```

      10      20      30      40      50      60      70
ORF3  MRSSAGSAAQGLIFDLFMRFGAIVMNMPEFVAGAFRMDHRFTLVSVSAFFGGPVSLVLTAGMAAGYRIY
Sec.Cons. ccccccchhhhhhhhhhhcEEEEccccccccccccccccEEEEccccccccEEEEhchh?ceeee
      80      90     100     110     120
ORF3  IGGMAAITGLIGVSSIVGLTAHYLTRSEPKIWHVLLFSAAVPLGVGAGLFLPPAL
Sec.Cons. ecchhhh?eccccEEEE??hhEccccccccEEEE?cccccccccccccccc
    
```

Figura 4.19: Estructura secundaria consenso del ORF3. Hh: Hélice α , Ee: lámina β , Cc: *random coil* (bucle al azar), ?: estados ambiguos.

Según el programa SOSUI la proteína ORF3 es una proteína de membrana que posee 4 hélices transmembrana (Figura 4.20), y según SOSUI (Signal) y SignalP 3.0 no tiene péptido señal. Según PSORT y PSORTb la proteína ORF3 probablemente está localizada en la membrana interna. No se han encontrado estructuras *coiled-coil*, HTH, cremalleras de leucinas, ni repeticiones.

```

      1 MRSSAGSAAQGLIFDLFMRFGAIVMNMPEFVAGAFRMDHRFTLVSVSAF 50
      51 FGGPVSLVLTAGMAAGYRIYI GGMAAITGLIGVSSIVGLTAHYLTRSP 100
      101 KIWHVLLFSAAVPLGVGAGLFLPPAL 127
    
```

Figura 4.20: Secuencia de la proteína ORF3 en la que se indican con subrayado punteado las hélices transmembrana predichas con SOSUI. Las hélices primarias son de color naranja y las secundarias de color azul.

4.2.2.4. Análisis de RzcC

El alineamiento de la proteína RzcC (ORF4) se puede ver en la Figura 4.21.

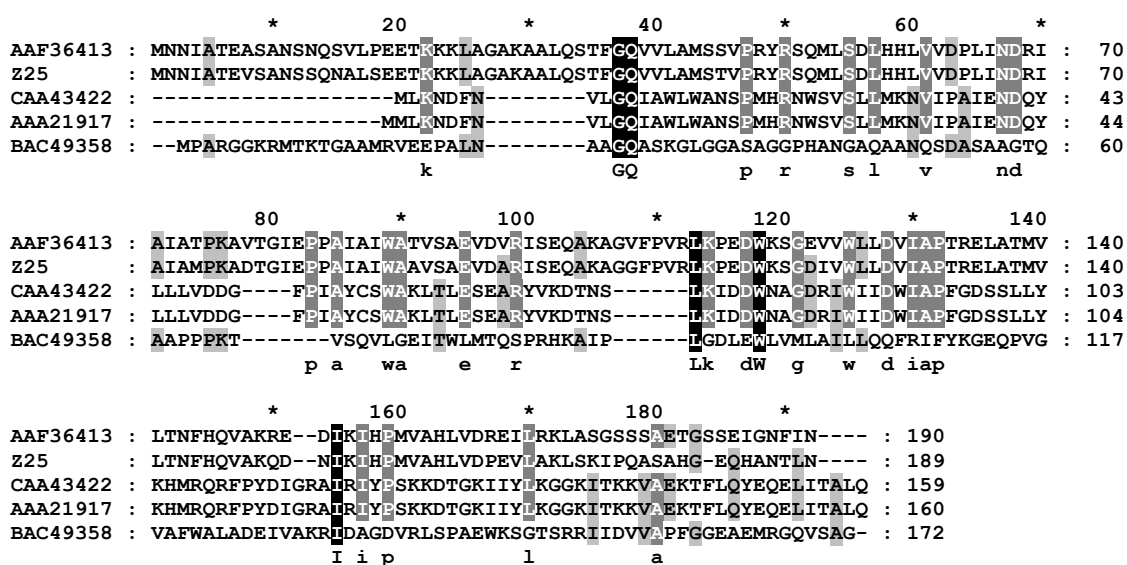


Figura 4.21: Alineamiento del ORF4 con secuencias de proteínas conocidas depositadas en bases de datos. AAF36413: RzcC de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 162Y10, Z25: RzcC de *Rhizobium leguminosarum* Z25, CAA43422: ApxIIC de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, AAA21917: ApxIIC de *Actinobacillus suis* 3714, BAC49358: Blr4093 de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. Sombreado: █ residuo 100% conservado, █ residuo 80% conservado, █ residuo 60% conservado.

Al emplear el programa RPS-BLAST se obtuvieron alineamientos con dos dominios conservados (Tabla 4.15). El dominio pfam02794 HlyC corresponde a la familia de aciltransferasas de toxinas RTX. Están relacionadas con la acilación de residuos de lisina de protoxinas, de manera que estas se convierten en toxinas activas. El donador del grupo acilo es acil-ACP (*acyl carrier protein*). La mutagénesis dirigida de un residuo conservado de histidina en un miembro de esta familia ocasionó la inactivación completa de la enzima. El dominio conservado COG2994 HlyC aparece en la aciltransferasa hemolisina:ACP (proteína activadora de hemolisina).

4.2.2.5. Análisis de RzcA

El alineamiento parcial de la proteína RzcA (ORF5) se puede ver en la Figura 4.23. Es interesante que hasta el aminoácido 2186 de la proteína RzcA no aparezcan residuos conservados en un 80%.

A) De la posición 2250 a 3500 (RzcA 2179-3389):

```

Z25      : DTINGGG*NDIINAGKGAD*SITGGRGNDVIDGG*GSWS*SMYYSRGDGNDIIVDGD-WS*GSDRLF*FKDVNS : 2247
AAF36415: DTINGGG*NDIINAGKGAD*SITGGRGNDVIDGG*GSWS*SMYYSRGDGNDIIVDGD-WS*GSDRLF*FKDVNS : 2296
BAB48496: -----*CDDVLVGSAAAGIMHG*GK*GNDITLD*CASGND*NVYARGD*GNDLITDG--YNDVGDRL*FTDINS : 70
CAA04800: -MIYGRGG*QDEIQEEGND*TLY*ENEND*LLT*GVGND*TYGYARGEGND*IIETADNS*SLDRL*IESDIDA : 69
00162014: -----*DDYLLGYQSN*ITLD*GGAGND*LLNG*GYGNNT*VVFCRGY*GID*IIVENY-NT*DTLSEK*TG*INP : 1772
          g D          d Gg gnD Gg d Y y RG GnDtI          g drl f d n

Z25      : SEVSLV*RNGNSLL*I*VI*AESAP*CV*GDGGSV*LLK*D*TIDGFYER*GL*ETIS*FADG*IS*WS*RDV*FVPMV*INQ*--- : 2314
AAF36415: SEVSLV*RNGNSLL*I*VI*AESAP*CV*GDGGSV*LLK*D*TIDGFYER*GL*ETIS*FADG*IS*WS*RDV*FVPMV*INQ*--- : 2363
BAB48496: STVSLV*SCNDV*T*I*VI*AESAP*CA*GDGGSV*RLK*D*ALDDHNR*GV*DQV*VFAD*CTI*WR*AGIRV*MLLD*OT--- : 137
CAA04800: SEIMLR*QK*CNDL*II*ET*AEST*SC*AGD*GG*ILV*SSV*AGD*LEHG*LES*IQ*FSD*G*TI*W*TKQ*DI*ISN*IS*VIE*PEG : 139
00162014: SDITFW*EK*SN*YPESD*NLYLA*IK*NTHD*Q*IIIE*D*QFR-SGPY*G*IDQ*FV*FAN*GT*I*WTRENI*QTW*LLQ*ST--- : 1838
          S l r gN i iaes g gdggs kd          Gi          FadG W r

Z25      : --GTP*CND*TI*TC*SN*IAD*LLAG*GK*CD*DTINGGG*CYD*TY*VYARG*CND*IMFD*GD-WS*GNG*DR*LLF*VD*INP*GN : 2381
AAF36415: --GTP*CND*TI*TC*SN*IAD*LLAG*GK*CD*DTINGGG*CYD*TY*VYARG*CND*IMFD*GD-WS*GNG*DR*LLF*VD*INP*GN : 2430
BAB48496: --ATV*CND*TI*TC*FN*VAD*TI*SK*AGND*ITD*GAG*CND*NY*VYARG*CND*ILTEG--YNDY*GR*LT*FTD*IDSSA : 203
CAA04800: IIG*TS*CADS*LE*CS*RGD*DL*IIC*LAC*DDALS*CS*FG*DDV*VYSS*Q*CG*DVIND*GVN*MSNEI*VL*RL*T*DLTAAD : 209
00162014: ---T*EDYLL*GYQSN*ITLD*GGAGND*LLNG*GYGNNT*VVFCRGY*AVD*IIVENY-NT*GTDT*V*SFKAG*ISKSD : 1903
          t G D G Dt G G D G G d Yy rG g Dt g          d l di

Z25      : ISLLRH*ENSLK*IL*IAETAPGAGD*GG*SILF*QD*TV*DGFYEK*CFE*T*IQ*FAN*CTV*W*IND*QVR*QML*VD*QAT--- : 2447
AAF36415: ISLLRH*ENSLK*IL*IAETAPGAGD*GG*SILF*QD*TV*DGFYEK*CFE*T*IQ*FAN*CTV*W*IND*QVR*QML*VD*QAT--- : 2496
BAB48496: VSI*VRN*END*V*VV*IAESAPGAGD*GG*SV*LLK*D*LEDNAGR*GID*Q*VFAD*CTN*WSRAQL*R*DILLT----- : 266
CAA04800: VMVARD*EN*LT*LI*ASG-----EVI*TVQ*K*FLSD*GYW*GI*EK*IE*FS*D*TS*NR*ETILD*IGR*DDA*PTVI : 273
00162014: VVFW*RK*NS*STE*QD*NLYLA*IK*NT*DR*LI*IED*QFR-SGPY*G*IDQ*FIE*AD*CTI*TR*SEINS*MSL*PNN*L--- : 1969
          R gn i          d          G i Fa GT w

Z25      : -TAGND*TI*TG*GRG*DTL*RG*SA*CD*DTINGGG*CYD*TY*VYARG*CND*IMFD*GD--DWSGNG*Q*IR*FVD*-VNPNE : 2513
AAF36415: -TAGND*TI*TG*GRG*DTL*RG*SA*CD*DTINGGG*CYD*TY*VYARG*CND*IMFD*GD--DWSGNG*Q*IR*FVD*-VNPNE : 2562
BAB48496: -----*CTT*ADE*TV*CF*SRD*TF*H*ARG*CGD*TI*IDG--V*NNGYND*Q*LV*ESD*-INPDD : 315
CAA04800: GTS*GN*DTL*NG*TG*DND*VFD*GG*CND*V*VG*ARG*SD*KYL*RL*ED*GSD*LIDEV--DWLND*V*TLK*LIN*-ISSSD : 340
00162014: ---EDNLV*T*DANANT*LENAT*CND*ITL*AGG*ICND*TY*IFK*Q*CYE*Q*IIQE*YSGLN*SY*Y*TV*KE*GAGL*TTNT : 2036
          g          g g dtL G g D y y G G D          g          D f

Z25      : VTLAR*CND*L*K*IL*IRESVAGAGD*GG*SILF*QD*TV*NGF*EKG*-F*ET*IR*FAN*G*-TI*W*IND*QVR*QML*DQAA*TA : 2581
AAF36415: VTLVR*CND*L*K*IL*IRESVAGAGD*GG*SILF*QD*TV*NGF*EKG*-F*ET*IR*FAN*G*-TI*W*IND*QVR*QML*DQAA*TA : 2630
BAB48496: VTLVGI*CND*V*K*VVVAESTT*GAGD*GG*SILK*DALANY*GQ*-IDK*IV*FAD*G*-TA*TRDD*FRAAIL*GLGATA : 383
CAA04800: VVA*VHN*CVN*L*Q*ITITS-----TGDV*TVK*DQW*YTSWGNAGL*SE*IE*FAD*G*-TW*DREA*IMA*IEG*PIV*GN : 403
00162014: MEI*VR*CDD*L*IFK*VKG-----SSDRL*TI*K*D*QFN-V*EVYAI*EFQ*FDNGAT*V*TKENIK*Q*HLLK*S--- : 2097
          v v G dl          g i D          y          e i Fa G T wt          T

```

Capítulo 4.2. Análisis predictivo de la región secuenciada

Z25 : GNDT I I N G S D R A D I L Q G D A G D D T I T G R G G S D L Y V W A H G D G S D T I I E G D W S G T G D R L Q L S D V N A Q D V T Y L R N : 2651
 AAF36415: GNDT I I N G S D R A D I L H G D A G D D T I T G R G G S D L Y V W A H G D G S D T I I E G D W S G T G D R L Q L S D V N A Q D V T Y L R N : 2700
 BAB48496: G D D T I I T G S ----- : 391
 CAA04800: G N D T I I E G T ----- : 411
 00162014: G N D Y I I V G Y S E G ----- : 2108
 G n D t I G

Z25 : G N D I V I I I R E S A P G A G D G S S I S L P Y F L D G Y Y E R G V E S V L F A D G T I Y T R A E I L P L L P I I Q A T A G N D S I D G S : 2721
 AAF36415: G N D I V I I I R E S A P G A G D G S S I S L P Y F L D G Y Y E R G V E S V L F A D G T I Y T R A E I L P L L P I I Q A T A G N D S I D G S : 2770
 BAB48496: ----- : -
 CAA04800: ----- : -
 00162014: ----- : -

Z25 : N G D D T F E G G L G N D V L N G L G G N D T Y R Y S R G D G A D T V I E --- G S A G C A D D R L V F T N I N S T E V S L S R N G T D L T : 2788
 AAF36415: N G D D T F E G G L G N D V L N G L G G N D T Y R Y S R G D G A D T V I E --- G S A G C A D D R L V F T N I N S T E V S L S R N G T D L T : 2837
 BAB48496: N S P D T I I T G G R G N D L N G V G C N D T Y I Y A R G D G N D T V T D --- G S G N C I N D R L V F T D I D P S M V S L V R I G S D V K : 458
 CAA04800: T D D N I T G G L G D D F L S G R L G S D V I V Y S S G D G N D V L D D K --- G S D I C G V D V L R L T V N A A D I V A T R D G L A L T : 479
 00162014: I N N E T L D G G L G N D T L A G G S G N D T Y I F K Q G Y G O D I I Q E G Y S G L N S Y Y D T V K F G A G L T T N T M E I I R Q G D L I : 2178
 dt G G I G n D L G G n D t Y y G d G D G s g d l t R G d l

Z25 : I T P K S T P T V N D A G S V L L R A A L D G D Q G G V E T V V F A D G V E W T K N D I R V K L L G A V S T T G N D T I T G F S S G D V I : 2858
 AAF36415: I T P K S T P T V N D A G S V L L R A A L D G D Q G G V E T V V F A D G V E W T K N D I R V K L L G A V S T T G N D T I T G F S S G D D I : 2907
 BAB48496: V V T A E S P G A G D A G S I V L K D I L G ----- D F I S ----- : 485
 CAA04800: L R I I S T N A L I T I E Q Q Y S S R N D P Y G ----- : 503
 00162014: F K V K G S S D R L T I K D Q F N V Y E V Y A ----- : 2201
 i s

Z25 : T G G L G N D T I N G A G G N D V Y H A R G D G N D V I T E A V A N G M A D T L A F N G I F A S D V S W G R S G T D L V L T I A P S V A G : 2928
 AAF36415: T G G L G N D T I N G A G G N D V Y H A R G D G N D V I T E A I A N G M A D T L A F N G I F A S D V S W G R S G T D L V L T I A P S V A G : 2977
 BAB48496: ----- : -
 CAA04800: ----- : -
 00162014: ----- : -

Z25 : G T D G S T I I L K G A L D A N A E Q G I E R F V F A D G T V W T -- F V D F A A Q V V N V A G T A A E T V N G T I N G S D I I R A N A G S : 2996
 AAF36415: G T D G S T I I L K G A L D A N A E Q G I E R F V F A D G A V W T -- F V D F A A Q V V N V A G T A A E T V N G T I N G S D I I R A N A D S : 3045
 BAB48496: ----- Q G V D K I L F A D G T V W T -- R P T I V G K L V D L L G T G N D S I N G T S A T D I I R G A A E N : 535
 CAA04800: ----- F E K I E F A D G S S I N R D A L M E L G R I P N I V G S G N D T L T G I W F N E T I S G G L E D : 553
 00162014: ----- L E E F Q E D N G A T V W T K E N I K Q H L L K S T P E D D Y L V G Y S W G I R N D I L D G G L E N : 2251
 e F a d G w G t g d i i g

Z25 : D V I N G G G G S D V Y L Y Q R G D G N D T I N D D A N G G S N --- D R L V L A D I N P A A V S L V R N G L D V S L V I A P T V A G G A D : 3063
 AAF36415: D V I N G G G G S D V Y L Y Q R G D G N D T I N D D A N G G S N --- D R L V L A D I N P A A V S L V R N G L D V S L V I A L T V A G G A D : 3112
 BAB48496: D T L N C A S G D D T Y L Y A R G D G N D T V N - E G F W D V N --- D R L V F T N I N R S G V S L V R N G N D L T V V I A E S A P G A G D : 601
 CAA04800: D V L M E D Y G S D T Y V N S G D G S D R V D D S Y S S D S --- D I I R L V D I N A G D I S L A R S G L D L K I T I L A T G A --- : 617
 00162014: D T L V C G T G D D T Y I F K Q G Y G O D I I Q E G Y S G L N S Y Y D T V K F G A G L T I Q T M E I V R E G N D L V F V K G S S D --- : 2317
 D G G D Y y G d G D d d l i n s l v R G D i

Z25 : G G T I L I K N E L D - E Y Y A R C L E Q V V F A D G - I V W S R A D L R T M V L Q Q --- A G T A G N D V I D G F N I --- A D T I R G G : 3125
 AAF36415: G G T I L I K N E L D - E Y Y A R C L E Q V V F A D G - I V W S R A D L R T M V L Q Q --- A G T A S N D V I D G F N I --- A D T I R G G : 3174
 BAB48496: G G S V L I K N T L D - D N N S W C V E K V V F A D G - I A W T R A D I R V A L L D Q --- A G T G N D T I I C F N V --- A D T L H E R : 663
 CAA04800: -- I M T I D D Q F D - P R W Y Y C L E K I E F A D G - S Y L S R A D L M A I N E S S Q T L V G T S A V D F L T S A S A --- N D T L E C K : 680
 00162014: -- R L T I K N Q F D Y P F E A I S I E E F Q E D N G A I I W T K E N I K Q Y L K S --- I S A D D Y I V G Y S E G I N N E T L D G G : 2380
 I k n D g E F a d G t w r a d l g T D i g d T G

Z25 : K G D D T L N G O G S N D T Y L Y A R G D G N D T I T D Y E N -- A G D D D R L V F N N - I N A S D V T L V R T G I D I K L V V A E S A A G : 3192
 AAF36415: K G D D T L N G O G S N D T Y L Y A R G D G N D T I T D Y E N -- A G D D D R L V F N N - I N A S D V T L V R T G I D I K L V V A E S A A G : 3241
 BAB48496: A G N D T L N G A G G D D T Y L Y A R G D G N D T V N E G F W -- D V N - D R L V F T D - I N P S G V S L V R N G N D L T V V I A E S A P G : 729
 CAA04800: Q G D D W M N C A A G S D T Y I Y A G D G N D I T D R E D D R L S D I D V L R L T D - L N A S D V A L V R A G P D I R V R I L S T G H E : 749
 00162014: L G N D T L V G C T G N D Y I F K Q G Y G O D I I Q E G Y S G F N S Y Y D T V K F G A G L T T N T M E I V R Q G N D I F K V K G S S D R : 2450
 G D t l n G D t Y y a G d G n D i D l f n s v l v R G D L s


```

          3300          *          3320          *          3340          *          3360
Z25      : VGDAGSIVLKNMLDDYYARGVDKVVFDG-GTAWTRADFRTKVLQQAS-IDGNDIDGDN---VADTIHGG : 3257
AAF36415: VGDAGSIVLKNMLDDYYARGVDKVVFDG-GTAWTRADFRTKVLQQAA-IDCKNTIDGDN---VADTIHGG : 3306
BAB48496: AGDGGSVLIKNTLDDNNSWGVEKVVFDG-GTAWTRADIRVALNQAD-TAGNDITGDN---VADTLHGR : 794
CAA04800: IT-----VWQFSSQSDFAGLERIEFDG-GSSWDRSVMAAESGEITG-SCNDTLNCTSG--DDVFNCG : 811
00162014: LT-----IKNQFDYPPFAISIEEFQEDNGAIIWIKEDIKOYLQSTD---GDYIVCYSEGINNEPLDGG : 2512
          g          Fad gt Wtr i l t G d i G dt Gg

          *          3380          *          3400          *          3420          *
Z25      : KGNDSLNGQGNNDIYIARSDCNDLITWDS--AGDDRLVFSID-INASDVTIVRSGLDKLKVAD---- : 3320
AAF36415: KGNDSLNGQGNNDIYVTRGDCNDVITIEYEN--AGGSDRLVFSID-ANAADVTLVRNGNDVTVLVAESAVG : 3373
BAB48496: AGNDTLNGAGGDDIYLVARGDCNDITVNEGFW--DVN-DRLVFTD-INPSGVSLVRNGNDITVVIASAPG : 860
CAA04800: LGDDHLYCAGGTIVYLVSSGDCSDYIDDEATE-PNSVDTLRFETD-INESDISVARNGVNDITVILATG-- : 877
00162014: LGDDTLVVGAGNDIYIFKHDYQDIIHQEYYAFNSYYDTVKEGRGLTPQTMELVROGNDIIFKIKDN--- : 2579
          G D L G g DtY y dG D i e D l F d n vR G dl v

          3440          *          3460          *          3480          *          3500
Z25      : VGDGGSILLKNMLDEYYARGVDKVVFDG-TILTRADFRTTVLQQASTDGNIDIDGFNVADTIHGGKGN : 3389
AAF36415: AGNAGSITLKASLQDYGRGVDIVFDG-TTWSRAMIAHIYVGGAGNETISGSSDADQIRAGAGND : 3442
BAB48496: AGDGGSVLIKNTLDDNNSWGVEKVVFDG-TTWTTRADIRVALLDQAGTGNITITGFNVADRIHGGGND : 929
CAA04800: ---DVTITIDEQWYDENGWCFEKIEFTGNSAICSTSORCPCARSPPGAYQRNPKSRSPVVGQHRRLPKE : 944
00162014: --IDQLTIKNQFDYPPYEVLSVEEFQEDNCAIWTKEIKNYLAT---TINNAPIVQNAIIDQITIGSNSPF : 2644
          gv F g t d n i d

B) De la posición 4350 a 4481 (RzcA 4208-4334):

          *          4360          *          4380          *          4400          *
Z25      : GTTETMVSIEALIGGAGNDILIGNAEANRLEGR LGNDTLTGGAGDDAVFKAG-FGRDITLDTETAG---- : 4272
AAF36415: -----DAAVFRAG-FGKDTVDTETVAG---- : 4101
BAB48496: -----DTETIHTN-FGSKITDETVVG-- : 957
CAA04800: ----- : -
00162014: -----AGNDKVENSLSEGIITITDESSSTNDVL : 3142
          d f f g d tdf

          4420          *          4440          *          4460          *          4480
Z25      : AASVDVLDISTDLFSDFAVMAAANQVCADTVLTHGAN-----TSITLKNVALTSLHQDDFRFTTA : 4333
AAF36415: VASDDFIDVNTSVFADFAVMAAATQVCADTVLTHNSS-----NIIITLKNVALTSLHDDDFHFTTA : 4162
BAB48496: AGSQDVIQFGNDVFADFAVSLAAATQVCADTVLTHDAG-----NTLITLKNVALANLHQDDFQFIAA : 1018
CAA04800: ----- : -
00162014: VVQSLASFNYTGTNPTANGYMRGISCSNLLQVDA DGVGSSAIFSTLVFTLNFTASNFQNNLIF--- : 3209
          a q g t i t l n f

Z25      : A : 4334
AAF36415: A : 4163
BAB48496: - : -
CAA04800: - : -
00162014: - : -

```

Figura 4.23: Alineamiento parcial del ORF5 con secuencias de proteínas conocidas depositadas en bases de datos. Se muestran las dos regiones del alineamiento en las que aparecen residuos conservados en un 80 y en un 100%. Z25: RzcA de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Z25, AAF36415: RzcA de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 162Y10, BAB48496: RzcA de *Mesorhizobium loti* MAFF303099, CAA04800: Bacteriocina de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 248, 00162014: Toxina RTX de *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (N° de acceso ZP_00162014). Sombreado: **C** residuo 100% conservado, **C** residuo 80% conservado, **C** residuo 60% conservado.

Al emplear el programa RPS-BLAST se obtuvieron alineamientos con dos dominios conservados (Tabla 4.16). El dominio pfam06594 HCBP_{related} es un dominio relacionado con las proteínas de unión a calcio tipo hemolisina. A menudo se

encuentran múltiples copias. El dominio COG2931 aparece en toxinas RTX y otras proteínas de unión a calcio relacionadas.

Tabla 4.16: Dominios conservados encontrados en el ORF5. Se indica el número de aminoácidos, la región con la que alinea, el porcentaje de alineamiento y el valor de E.

Nº de acceso	Dominio	Nº de aminoácidos	Posición	% de alineamiento	Valor de E
CDD26706, pfam06594	HCBP_ <i>related</i>	43	3966-4009	100,0%	6e-06
			3181-3229	100,0%	9e-06
			3569-3617	100,0%	2e-05
			3049-3097	100,0%	3e-05
			3701-3749	100,0%	9e-05
			2917-2965	100,0%	1e-04
			3441-3485	100,0%	5e-04
			3313-3357	100,0%	5e-04
CDD12280, COG2931	COG2931	510	3492-3933	77,1%	0,009

```

1  MTDYIVDTANFYTLVRMNGSSGLEVLQALIDAGHKIVITDAVEAEITFSA 50
51  AALHKDAQIASAWIRAHQSEIEIVPTNTFQDLFPNGSNGSPLPRDLGEES 100
101 ILWLANSRRYADNPAAIIVSDDSSFFGPDIFNPTKSIQDGVVRHSTDFLLK 150
151 YALDIDLIDPTDYAILRDELDFATGRIEIKHSYTNSDLVLTSTVDPIDGSL 200
201 VYKNIAGDEVHLSFVATDPFVNLQKVFVIYAGALSEAHDGINGSLVGDNS 250
251 IVSLLARFMADNSGGVDPVAFVFAEAQAHLFNQLKEGFSHPNFEASFAGLV 300
301 AQFGSAIGDAAELLNAAAYEPFIYGFQTGDWSKLGETVFEFGLSSAIGSFV 350
351 VGAAAVGVGITLGTAAEIEFAVGVVAVGISDGINAALSLASKIFDDLTEA 400
401 IQPQEQPSQQLDDLLIRRLLDGLYDQDNPNFQLKDVLRQLVTLASAEGP 450
451 DFRLTGPFPGPYDAEHATLIIGTANSDRITSTDDNDVIFsGAGDDVVTarG 500
501 GKDIVLGGAGSDIFTDSVTEGTEDGRSNEDDIYVGSEAFGDVSNFHNWL 550
551 SGGGeTDIVRYTVDSLVAADDPETPDDEGRLQQEGVRVTELSLSNIHTIQT 600
601 VAITVEDRAKGNAATDQLIGIEKVELSGRPDELIVKDHSLDVAILIDMGK 650
651 SGRIESELVGEALTSDAFTIKVDVVDYSGLSHGINYLNVTSDHNDVDT 700
701 LDNIFQWQGYDQELLTIVDYAAKALGYNNALHVQGADQVKLSDDHDDVLI 750
751 SADFGSIIITtGEGQDKIWFTNGIGVTDLSSDRIALGGVLTLYGGLKNEA 800
801 SEDPYAWGPYGTSYGLNAEGELVIRNAFWHVANPDGTPSDDVATMYVLNW 850
851 KDRTTQGPGEVGEVGGGIFLAEYHMSFVRFRDITLDMKGQYSVLGEGAF 900
901 DILGLMIKTMTGHYPWGGQDFLVLVDLDGDGIELTALDRSKSKLDDLDNDLY 950
951 SEVSGFVGKDDGVLVLRDLNGDGkITGSDeMFGNATTSGLATLALLDGNHD 1000
1001 GkvDAADsGLADFNGDGavTAADsFSSLLVWQDANeNhrtDAGELLKSVVE 1050
1051 RGIASINVTPTGTVPQVVNGNTIASTAGYTLADGTVRTIADVLLKLDNQ 1100
1101 NTTYVGAPIQVSQSVVDLADLRGRGTLVSLHEAMSVLPAAETA VRAAIQT 1150
1151 LTSPVLSDLREAIRPILTAWAQSPVKIGADIITGAAGLTAYDDLAI VRK 1200
1201 DGDVVVDYAWGVSSSGDGTSDIPGIRMASGVIVSSSEGASGRGELTGLLSQ 1250
1251 WTGGGSSIVVTTGTELHNGVAVSYLDYRDGDDYLRIYNYQKADWSSNLAS 1300
1301 SANHTLGSVVVIDTIAGSDFSFYERLIGESLQAFFDVPDSAAAGYQAVAA 1350

```

1351 FLDKMDDALNLFVRLAVQSGPLAHYFDSIDYNAQSDGFTSKSGSQIAAV 1400
 1401 FTALLADAEQSSDAVSWLTDWKPFDFVFLSDYSRGSASQKNTYAFLAQN 1450
 1451 LNAVEQNAGGISVVDFAHAFGMAQDLFFGTGEVnGSGQDDILIVDGGET 1500
 1501 VVRG**GTGS**SDSYIIGKSFSGSTEIFDDDGGLGGSVDTIRFSAHNAGDIIASRD 1550
 1551 GIDLLLTDKATGAVLRITNEFEGRWPGSMIGDASRDYGVNQIVFKDGTVW 1600
 1601 TKVDIAEAVSKIDDASTHVVGtEdIDVLQ**GKGDDLLEGGGdTDI**RYGR 1650
 1651 **GDGQDTIH**DFEGNAFRNDQDMLQFLDGISSDDLIFQRDGASNDLVIRFKN 1700
 1701 SPLDQITIRGQFAATYTGPGTWYMNRIIDLFTFDDGSSLTSDQVASIVLQ 1750
 1751 AHst**DGNDELYGmErEDILRaGKGDDFISGGNqNDLYLYALGDGH**DVIQD 1800
 1801 RMTNILSGTDDFLRFAGIDREDITFGRVDGDRHSIVIYVNG**EGGSiTLQ** 1850
 1851 NEFAYAASGVFGDIFFDRIERIDFTSGDQSIAWYQIATTVIAGQkt**DGAD** 1900
 1901 **VIEGfDiDDVLDGGAGNDTLYGyNGNDTYVWGrGYGNDQIQ**ERGAGALNG 1950
 1951 GDYDKIIFHDYVSADDIVLSRTPGASDIIITLKDTGETLTLIEQVSYNAI 2000
 2001 NYRPDQVDEIHFSDBGVIWYASDIRAHYLLDAKTGDGDHIIYGFWTNNTLD**G** 2050
 2051 **GAGNDILEGGDGS**DTYVFGy**GYGHDEIRE**NYGIVTYDDDDAVRFAAGVDL 2100
 2101 DDVTFQRSGEYDLLISLAGSSDTLLITSEFYGVWDMND**VERFLFADGT**Q 2150
 2151 ITREQISQRMIEAQst**SGDDTINGfElNDTINGGGGNDIINaGKGADSIT** 2200
 2201 **GGRGNDVIDGGGwSDSYYSrGDGNDTIV**DGDWSSGSDRLFFKDVNSSEV 2250
 2251 SLVRNGNSLLIVIAESAPGVGDGGSVLLKDTIDGFYERGIETISFADGIS 2300
 2301 WSRDVFVPMVINQQ**GtPGNDTITGsNiADTLAGGKDDTINGGGGYDTYV** 2350
 2351 YAr**GDGNDTmFDGDW**SGNGDRLLFVDINPGNISLLRHGNSLKILIAETAP 2400
 2401 GAGDGSILFQDQTVDFYK**GFETIQFANGT**VWNTNDQVRQMLVDQAtt**AG** 2450
 2451 **NDTITGtGrGDTLRGsAGDDTLNGGGGGDAYV**YAr**GDGSDTmFDGDW**SGN 2500
 2501 GDQIRFVDVNPNEVTLARQGNLKLILIRESVAGAGDGGGILFQDQTVNGFY 2550
 2551 EK**GFETIRFANGT**IWTNDQVRQMLMDQAat**AGNDTINGsDrADILQGDAG** 2600
 2601 **DDTITGrGGS**DLVYWah**GDGSDTII**EGDWSGTGDRLLQSDVNAQDVTYLR 2650
 2651 NGNDIVIIRESAPGAGDGSSISLPYFLDGYIER**GVESVLFADGT**IYTRA 2700
 2701 EILPLLPPIQat**AGNDSIDGsNGDDTFEGGLGNDVLNGLGGNDTYRYSrG** 2750
 2751 **DGADTVI**EGSAGGADRLVFTNINSTEVSLSRNGTDLTITIPKSTPTVND 2800
 2801 AGSVLLRAALDGDQ**GVETVVFADG**VEWTKNDIRVKLLGAVst**TGNDTIT** 2850
 2851 **GfSsGDVITGGLGNDTINGaGGNDVYHYArGDGNDVITE**AVANGMADTLA 2900
 2901 FNGIFASDVSW**GrSGTDLVL**TIAPSVAGGTDGSTITLKGALDANAEO**QIE** 2950
 2951 **RFVFADGT**VWTFVDFAAQVVNVAGTTAAETVNG**tNGSDIIRanAGSDVIN** 3000
 3001 **GGGSDVYL**YQr**GDGNDTIN**DDANGGSNDRLVLADINPAAVSLVRNGIDV 3050
 3051 SLVIAPTAVAGGADGGTILIKNELDEYYAR**GLEQVVFADGT**VWSRADLR 3100
 3101 VLQQA**GtAGNDVIDGfNiADTIRGGKDDTLNGqGsNDTYLYArGDGNDT** 3150
 3151 **IT**DYENAGDDDRLVFNINASDVTLVRTGIDLKLVVAESAAGVGDAGSIV 3200
 3201 LKNMLDDYAR**GVDKVVADGT**AWTRADFRTKVLQQAst**DGNDIIDGfNv** 3250
 3251 **ADTIRGGKNDSLN**GqGnNDTYIYAr**sDGNDLITE**WDSAGDDDRLVFSDI 3300
 3301 NASDVTLVRSIDLKLMDVADVGGSILLKNMLDEYYAR**GVDKVVADGT** 3350
 3351 ILTRADFRTTVLQQAst**DGNDIIDGfNvADTIRGGKNDSLN**GqGnNDTY 3400
 3401 **IYAr**s**DGNDLITE**WDSAGDDDRLVFSDINASDVTLVRSIDLKLMDVADVG 3450
 3451 DGGSILLKNMLDEYYAR**GVDKVVADGT**ILTRADFRTTVLQQAvt**DGNNDT** 3500
 3501 **IDGfNvADTIRGGRGDDSLN**GqGnNDSYLYAr**GDGNDAITE**YENAGDDDR 3550
 3551 LVFNINASDVTLVRTGIDLKLVAESAAGVGDAGSIVLKNMLDDYAR**G** 3600
 3601 **VDKVVADGT**IWTRATIRTKLLAQAAATDGNNTIDGfNv**ADTIHGGKGD**S 3650
 3651 **LN**GqGnNDTYVY**TrGDGNDVITE**YENAGGSDRLVFADANAADVTLVRNGN 3700
 3701 DVTVLVAESAVGAGNAGSITLKASLQDY**yGRGVDAIVFADGT**TWSRADMI 3750
 3751 AHIAVVG**GaAGNeTISGsSdTDQIRaGAGNDTLVGGAGNDTYFYSaGDGN** 3800
 3801 **DILDE**QTSQTDVDVLRHLHLLKSEVRFERSASAPNDVMIRVLATGEAITL 3850

RzcA	3580	3590	3600	3610	3620	3630	3640
Sec.Cons.	KLAVAESAAAGVGDAGSIVLKNMLDDYYARGVDKVVVFADGTIWTRATIRTKLLAQAATDGNNTIDGFNVAD						
RzcA	3650	3660	3670	3680	3690	3700	3710
Sec.Cons.	TIHGGKGDSDLNGQGNNDTYVYTRGDNDVITEYENAGGSDRLVFADANAADVTLVRNGNDVTVLVAESA						
RzcA	3720	3730	3740	3750	3760	3770	3780
Sec.Cons.	VGAGNAGSITLKASLQDYYGRGVDAIVFADGTWTSRADMIAHIAYVGGAGNETISGSSDTDQIRAGAGN						
RzcA	3790	3800	3810	3820	3830	3840	3850
Sec.Cons.	DTLVGGAGNDTYFYSAGDGNLDEQTSQTDVVDVLRHLHDLKSEVRFERSASAPNDVMIRVLTGEAITL						
RzcA	3860	3870	3880	3890	3900	3910	3920
Sec.Cons.	KNQFNLAGVESIVFKDGEVLGGAAGALDTALRSLVAIYGTAGNDTLVGTVDNDFIGSGDDRYNSGTG						
RzcA	3930	3940	3950	3960	3970	3980	3990
Sec.Cons.	SDIYLYAKGGSDYIDQSSSTVDVDVLRFSDDLADGVDVTFSRSGVHTLITVNETGAVITLDEQLSSTTAN						
RzcA	4000	4010	4020	4030	4040	4050	4060
Sec.Cons.	WGLERIEFADGTVWNRAQISSASWIRGTAGNDTLTGTGNDTLYGGAGNDTLNGGDGSDIHFGGDGDDLL						
RzcA	4070	4080	4090	4100	4110	4120	4130
Sec.Cons.	IGNVGADSFDDGNGVDTLDFYYTGASHVIDLSAGVVFTFDNSTTEQILNIENVIGSGVNDIRGSSADN						
RzcA	4140	4150	4160	4170	4180	4190	4200
Sec.Cons.	RLDGGAGNDGISGNDGNDILIGGDGDDTLRGGSGNDTLIGGTGFDSFDGGDGFDTGDFSYSTAAWTLDLQ						
RzcA	4210	4220	4230	4240	4250	4260	4270
Sec.Cons.	QKALSSGTTETMVSIEALIGGAGNDLIGNAEANRLEGRLGNDTLTGAGDDAFVFKAGFGRDITLDFTF						
RzcA	4280	4290	4300	4310	4320	4330	
Sec.Cons.	AGAASVDVLDISTDLFSDFASVMAAANQVGADTVITHGANTSITLKNVALTSLHQDDFRFTTAA						

Figura 4.25: Estructura secundaria consenso del ORF5. **Hh:** Hélice α , **Ee:** lámina β , **Cc:** *random coil* (bucle al azar), **?:** estados ambiguos.

Según el programa SOSUI la proteína ORF5 es una proteína de membrana que posee 2 hélices transmembrana (Figura 4.24), y según SOSUI (Signal) y SignalP 3.0 no tiene péptido señal. Según PSORTb se trata de una proteína extracelular que podría tener varias localizaciones. No se han encontrado estructuras *coiled-coil*, HTH, ni cremalleras de leucinas. En este caso los motivos repetidos se han buscado con la ayuda del programa fuzzpro de EMBOSS (Figura 4.24).

4.2.2.6. Análisis de RzcD

El alineamiento de la proteína RzcD (ORF6) se puede ver en la Figura 4.26.

Capítulo 4.2. Análisis predictivo de la región secuenciada

```

                *           20           *           40           *           60           *
Z25      : -----M A V L S S L R K A F L C V G L T S C V I N I L A L T G S F F M L Q V Y D R V I P G R S I P T L V G L G V I A : 55
AAD34890 : -----M A V L S S L R K A F L C V G L T S C V I N I L A L T G S F F M L Q V Y D R V I P G R S I P T L V G L G V I A : 55
BAB48495 : -M P Q S R P S E P P R T T L A A V I G S F R A F A C I A L M S G V V N I L A L T G S F F M L Q V Y D R V I P G R S V P T L V G L A V A : 69
AAL44196 : M G F Q N H Q Q T P P Q S L T A A V V S P L K S T F L C V A L V S G V V N I L A L T S P L F M L Q V Y D R V L A S G S I P T L V G L A L L A : 70
BAC53179 : ---M A A V P G V R R S E L A D A L R A C T A F V C V G L M S C M I N I L Y L T G S I F M L E V Y D R V L P S R S I P T L V G L I I I A : 67
                a l r a F G v L S v N i L a L t G s F M L q V Y D R V p r S P T L V G L A
                *           80           *           100          *           120          *           140
Z25      : A L F F V F Q C I L E L F I R S L L F V R V C T A V D E R F G D R V Y G S L V L L P S R M Q M P G D G L Q C V R D L D T V R G F L S G P G P T : 125
AAD34890 : V T L F V F Q C V L E F I R S M L L F V R V C T A V D E R F G D R V Y G S L V L L P S R M Q M P G D G M Q C V R D L D T V R G F L S G Q G P T : 125
BAB48495 : G T L F V F Q C V L E L F I R S R L F V R I C M G L D A K L S G V Y A A L M R I P L R T K L A C D G L Q S I R D L D Q V R S F L S S A G P T : 139
AAL44196 : L G I Y G F Q C L L D I I R A R V L I R I C E D F D M R Y S G R V H D A V V R L P L V N R M P G D G L Q P I R D L D N V R G F L S G T G P T : 140
BAC53179 : S F I Y A A Q G V L D M I R N R I I G R I C T A L D E A L N K R V E D T V V R I P L L I G S R N E G L Q P I R D L D N V R S F L G M G P S : 137
                L f Q g L I R L R G D r V v L P g d G l Q R D L D V R F L s g G P t
                *           160          *           180          *           200          *
Z25      : A L F D M P W M P F Y L C F L F H F W I G V T A L A G A L M I I G L T V L T E V R S R O P A K E A A K L A A E R I N L A E A T K R N S E : 195
AAD34890 : A L F D I P W M P F Y L L C F L F H F W I G V T A L A G A L I I I G L T V L T E F R S R O P A K E A A K L A A E R I N L A E A T K R N S E : 195
BAB48495 : A L F D L P W M P L Y L G I C F L F H F W I G M T A L A G A I I I F S L T L F A E A R T R E P A K E A N R Q A A A R N T L A E A T R R N V E : 209
AAL44196 : A F F D L P W M P L Y L G L C F L F H V W I G V T A L A G A V L I V S L T I L T N I F S Q K P I R D T M V E N M A R N R O L E A S R R N A E : 210
BAC53179 : A F F D L P W P L Y L A I C E A F H V M I G V T A L V G A I I I V G L T V V T E F M S R O P A K D A M G L A A Q R N D L A A S S R R N A E : 207
                A F D P W m P Y L C F L F H v I G v T A L A G A L L T t e s r P a k a a a R l a e a R N E
                220           *           240           *           260           *           280
Z25      : A V L A M G F C H F I G L R W T E I N R K Y L A N H V A A S T V T G G L A T A S K I L R M M L Q S G V L A V G A L L V I R Q E A S G G I M I : 265
AAD34890 : A V L A M G F C H F I G L R W T E I N R K Y L A N H V A A S T V T G G L A T A S K I L R M M L Q S G V L A V G A L L V I R Q E A S G G I M I : 265
BAB48495 : V L Q A M G F C S R I A G R W A D I N A E Y L G T N A K A S D L A G T L G T I S K I L R M M L Q S G I L A I G A W L V I H Q E A T G G I M I : 279
AAL44196 : V V Q A M G C R R L G K R W Q S S N E A Y L A A N R R A C D V A G G L G N L A K S L R V V L Q S A I L A V G A W L V I R Q E A S G G V M I : 280
BAC53179 : V M V M G M T S R M N Q R W S E A N E K Y L V G N Q R A S D V A G G L G A V A K V L R M M L Q S A V L A V G A Y L V I H Q E A T A G I I I : 277
                a M G g R W N Y L A s v G g L K L R m m L Q S L A v G A L V I Q E A g G i m I
                *           300           *           320           *           340           *
Z25      : A S S I L V S R A L A P V E L A I G Q W K G F V A A R Q S W A R L I K L M T I M S S E Q R E V A L E P A P R E S I T V E N L Q I A A P G G R : 335
AAD34890 : A S S I L V S R A V A P V E L A I G Q W K G F A A A R Q G W A R L I K L M T I M S S E Q H E V A L P P P R G S I T V E N L Q I A A P G G S : 335
BAB48495 : A S S I M M S R A L A P I E L A I A H W K S F V T A R Q A W A R L I Q L L A L L P E T A T T V S L P A P T A A L V E G I S V T P P G E R R : 349
AAL44196 : A S S I M M C R A L A P V D L A I S N W K S F V A A R Q S W A R L R E L F A Q M P A N A A M A L E K P E K E L R V E N V T I V P P G E K : 350
BAC53179 : A C S I L S A R A L A P V D L A I A H W K S F V A A R Q S W O R L I R L L E Q M P A Q T M P T Q L O A P T S R L S V E G V A M V E P G D Q R : 347
                A s S I R A L A P v L A I W K F v a A R Q W a R l T L m L p P L V E P G R
                360           *           380           *           400           *           420
Z25      : T I L R G V S E K V S A G E A V G V I G P S A S G K S I L A R A V T G L W L E L G G S V R L D Q A L L T Q W D P R E L G R H V G Y L P Q D V : 405
AAD34890 : P I V R G V S E K V S A G E A V G V I G P S A S G K S I L A R A I T G L W L E L G G A V R L D Q A L L A Q W D P R E L G R H I G Y L P Q D V : 405
BAB48495 : V V V Q D A G F A L E K C A G L G I I G P S A S G K S I L V R A I A G I W L P G R G A V R L D C A T L D O W S P E E L G R H V G Y L P Q D V : 419
AAL44196 : P T V T G L G E V V T A G N A L C H I G P S A S G K S I L A R I L T G A W P A A G V R L D C A S F D Q W D R E T L G R H I G Y L P Q C V : 420
BAC53179 : L I V Q D I T E A L A G N G L G V I G P S A S G K S I L A R I L V G V W Q E V R G V R L D C A A L D O W S S D M L G R H I G Y L P Q D V : 417
                v F a G G I G P S S G K S L R a G W P G V R L D A l Q W L G R H G Y L P Q d V
                *           440           *           460           *           480           *
Z25      : S L F D G S I A O N I G R F D E D A G S E A I I A A A R A A G V Y E M I V Q F P D G F D T K I G E H G S A L S A G O R Q R I A L A R A L Y G : 475
AAD34890 : S L F D G S I A O N I A R F D P D A G S E A I I A A A R A A G Y D M V V Q F P D G F D T K I G E H G S A L S A G O R Q R I A L A R A L Y G : 475
BAB48495 : Q L F D G T I A E N I A R F E B E A P S D K I L S A A R A A G V H D L V H L P E G Y E T R I G E A G S A L S A G O R Q R V A L A R A L Y G : 489
AAL44196 : E L F D G T I G E N T S R F D D N P D P E A I I A A A R A A G A H E L I L R F E K G Y D S D I G E A G S I L S A G O R Q R I C L A R A L Y G : 490
BAC53179 : E L F G G T I A O N I S R F D B E A T S D G I I A A A K E A G V H E M I I K M R E G Y N T O V G E O G G A L S A G O A Q R V A L A R A L Y G : 487
                L f D g I a N I R F d p a s I i a A A r a A G v G t i G E G s a L S A G o r Q R a L A R A L Y G
                500           *           520           *           540           *           560
Z25      : D P F L V V L D E P N S N L D A D G E A A L T R A I S C V R S R G G I A I V I A H R P S A L V A V D K I L V M G N G Q M O A F G P K D E V L : 545
AAD34890 : D P F L V V L D E P N S N L D A D G E A A L T R A I S C V R A R G G I A I V I A H R P S A L V A V D K I L V M G N G Q M O A F C L K D E V L : 545
BAB48495 : D P F L V I L D E P N S N L D S E G E A A L T E A I Q C V R A R G G I A V V V A H R P S A L A S I D Q V L V M A N G R V O A F G P K N E V L : 559
AAL44196 : D P F I V L D E P N A N L D A E G E A A V V K A I T S V K A R G G I A V V V A H R P S A I G A V D Y I I L M E D G R M K A F C E R D E V L : 560
BAC53179 : N P F L I V L D E P N S N L D T E C D E A L T R A I R A A R E R C A L I V V V A H R P I G V E A V D O I L V L R D E R M O A F G P K E O V L : 557
                d P F l v v L D E P N s N L D G e a A l T A I v r R g G i a V A H R P s a a v D i L v m G m q A F g p k e V L

```

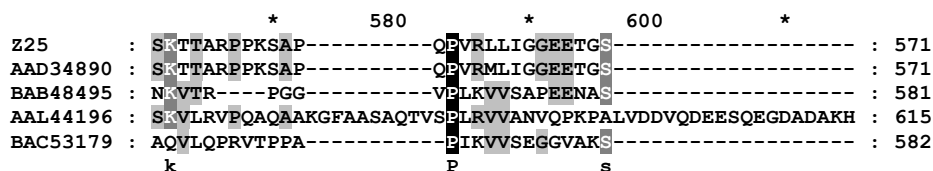



Figura 4.26: Alineamiento del ORF6 con secuencias de proteínas conocidas depositadas en bases de datos. Z25: RzcD de *Rhizobium leguminosarum* Z25, AAD34890: RspD de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, BAB48495: RspD de *Mesorhizobium loti* MAFF303099, AAL44196: PrsD de *Agrobacterium tumefaciens* C58, BAC53179: transportador ABC de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. Sombreado: █ residuo 100% conservado, █ residuo 80% conservado, █ residuo 60% conservado.

Al emplear el programa RPS-BLAST se obtuvieron alineamientos con varios dominios conservados. En la Tabla 4.17 se indican los dominios de cada familia que dieron alineamientos con valores más bajos de E. El dominio cd00267 corresponde al dominio de unión a nucleótidos de los transportadores ABC. Este dominio muestra la mayor similitud entre los miembros de esta familia. Todas las proteínas con dominios de unión a nucleótidos poseen los motivos Walker A/P-loop y Walker B, y los transportadores ABC además tienen un motivo C distintivo (*signature*), un motivo Q-loop, y un motivo H-loop/switch region. El dominio pfam00005 corresponde al dominio de unión a nucleótidos de los transportadores ABC, al igual que el dominio conservado cd00267. El dominio COG4618 ArpD corresponde a un sistema de transporte de proteasas y lipasas tipo ABC, y abarca los dominios transmembrana y de unión a nucleótidos.

Tabla 4.17: Dominios conservados encontrados en el ORF6. Se indica el número de aminoácidos, la región con la que alinea, el porcentaje de alineamiento y el valor de E. A continuación se encuentra la secuencia del ORF6 en la que se indica en rojo la región que alinea con el dominio conservado cd00267. Se muestra el motivo Walker A, el motivo C distintivo (PDOC00185) y el motivo Walker B (Dean et al., 2001) con subrayado continuo. Los fallos están en minúscula. Asimismo se indican con subrayado punteado las hélices transmembrana predichas con SOSUI. Las hélices primarias son de color naranja y las secundarias de color azul.

Walker A: (AG)XXXXGK(ST)

Motivo C: LSGGQ

Walker B: DEATSALD

Nº de acceso	Dominio	Nº de aa	Posición	% de alineamiento	Valor de E
CDD5341, cd00267	ABC_ATPase	217	321-540	99,5%	4e-43
CDD25356, pfam00005	ABC_tran	183	348-533	100,0%	1e-30
CDD13766, COG4618	ArpD	580	2-567	97,4%	0.0

```

1 MAALSSLRKAFLGVGLTSCVINILALTGSFFMLQVYDRVIPGRSLPTLVG 50
51 LGVIAATLFVFQGILELIRSLLLVRVGTAVDERFGDRVYGSLVLLPSRMQ 100
101 MPGDGLQCVRDLDTVRGFLSGPGPTALFDMPPWFYLFLCFLFHFWIGVT 150
151 ALAGALMLIGLITVLTVEVRSRQPAKEAAKLAERINLAEATKRNSEAVLAM 200
201 GFGHFIGLRWTEINRKYLANHVAASTVTGGLATASKILRMMLOSGVLAVG 250
251 ALLVIRQEASGGIMIASSILVSRALAPVELAIGQWKGFVAARQSWARLTK 300
301 LMTLMSSEQREVALPAPRESLTVENLQIAAPGGRRRTILRGVSFKVSAGEA 350
351 VGVIGPSASGKSTLARAVTGLWLPLGGSVRLDQALLTQWDPRELGRHVGY 400
401 LPQDVSLFDGSIAQNIGRFDPDAGSEAI IAAARAAGVYEMIVQFPDGFDT 450
451 KIGEHGSALSaGQRQRIALARALYGDPPFLVVLDEpnSnLDADGEAALTRA 500
501 ISGVRSRGGIAIVIAHRPSALVAVDKILVMGNGQMQAFGPKDEVLSKTTA 550
551 RPPKSAPQPVRLLIIGGEETGS 571
    
```

En la Figura 4.27 se indica la estructura secundaria consenso de RzcD (ORF6).

```

          10          20          30          40          50          60          70
D      MAALSSLRKAFLGVGLTSCVINILALTGSFFMLQVYDRVIPGRSLPTLVGLGVIAATLFVFQGILELIR
Sec.Cons. c?hhhhhhhhhhcchhhhhhhhhhccc?eeeecccccccccccc??c?chhhhhhhhhhhhhhhhh
          80          90          100         110         120         130         140
D      LLLVRVGTAVDERFGDRVYGSLVLLPSRMQMPGDGLQCVRDLDTVRGFLSGPGPTALFDMPPWFYLF
Sec.Cons. hheecccccccccccc?eeeccccccccccch?hhch?h?e?cccccccc?ccccchhhhh
          150         160         170         180         190         200         210
D      FLFHFWIGVTALAGALMLIGLITVLTVEVRSRQPAKEAAKLAERINLAEATKRNSEAVLAMGFGHFIGLRW
Sec.Cons. hhhh?e?hhhhhhhh??hhhhhh?ccc?hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhcccceech
          220         230         240         250         260         270         280
D      TEINRKYLANHVAASTVTGGLATASKILRMMLOSGVLAVGALLVIRQEASGGIMIASSILVSRALAPVEL
Sec.Cons. hhhhhhhhhhhh??cchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhheeehhccccch?hhhhhhhhhh?hhhh
          290         300         310         320         330         340         350
D      AIGQWKGFVAARQSWARLTKLMTLMSSEQREVALPAPRESLTVENLQIAAPGGRRRTILRGVSFKVSAGEA
Sec.Cons. hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhcchhhhcccccccceeehhhhcccccccceeeecccc
          360         370         380         390         400         410         420
D      VGVIGPSASGKSTLARAVTGLWLPLGGSVRLDQALLTQWDPRELGRHVGYLPQDVSLFDGSIAQNI
Sec.Cons. eeeccccccchhhhhhh?ccccce?hhhhhhcccccccccccccccc??ccc?hhhhcccc
    
```

```

          430      440      450      460      470      480      490
D      PDAGSEAI IAAARAAGVYEMIVQFPDGFDTKIGEHGSALSAGQRQRIALARALYGD PFLVVLDEPNSNLD
Sec.Cons. . cccchhhhhhhhhhhcch?eeeeccccccccccccchhchhhhhhhhhhhcccccccccccccc
          500      510      520      530      540      550      560
D      ADGEAALTRAI SGVRSRGGIAIVIAHRPSALVAVDKILVMGNGQM QAFGPKDEVLSKTTARPPKSAPQPV
Sec.Cons. . h?hhhhhhhhhhccccccccccccchhee?h?eeeecccccccccccc?hh??cccccccccccc
          570
D      RLLIGGEETGS
Sec.Cons. . eeeccccccc

```

Figura 4.27: Estructura secundaria consenso del ORF6. Hh: Hélice α , Ee: lámina β , Cc: *random coil* (bucle al azar), ?: estados ambiguos.

Según el programa SOSUI la proteína ORF6 es una proteína de membrana que posee 5 hélices transmembrana (Tabla 4.17), y según SOSUI (Signal) y SignalP 3.0 no tiene péptido señal. Según PSORT y PSORTb esta proteína probablemente está localizada en la membrana interna. No se han encontrado estructuras *coiled-coil*, HTH, ni cremalleras de leucinas. Con el programa Radar se ha observado la existencia de dos tipos de repeticiones (Tabla 4.18).

Tabla 4.18: Repeticiones encontradas con el programa Radar en el ORF6.

Posición	Repeticiones
409-434	DG _s IAQNIGRFDP . . DAGSEAI IAAARA
446-472	DG . FDTKIGEHGSALSAGQRQRIALARARA
476-500	DP . FLVVLDEPNSNLDADGEA . . ALTRA
229-250	GGLATASKIL . RMMLQSGVLAVG
261-283	GGIMIASSIL _v SRALAPVELAIG

4.2.2.7. Análisis de RzcE

El alineamiento de la proteína RzcE (ORF7) se puede ver en la Figura 4.28.

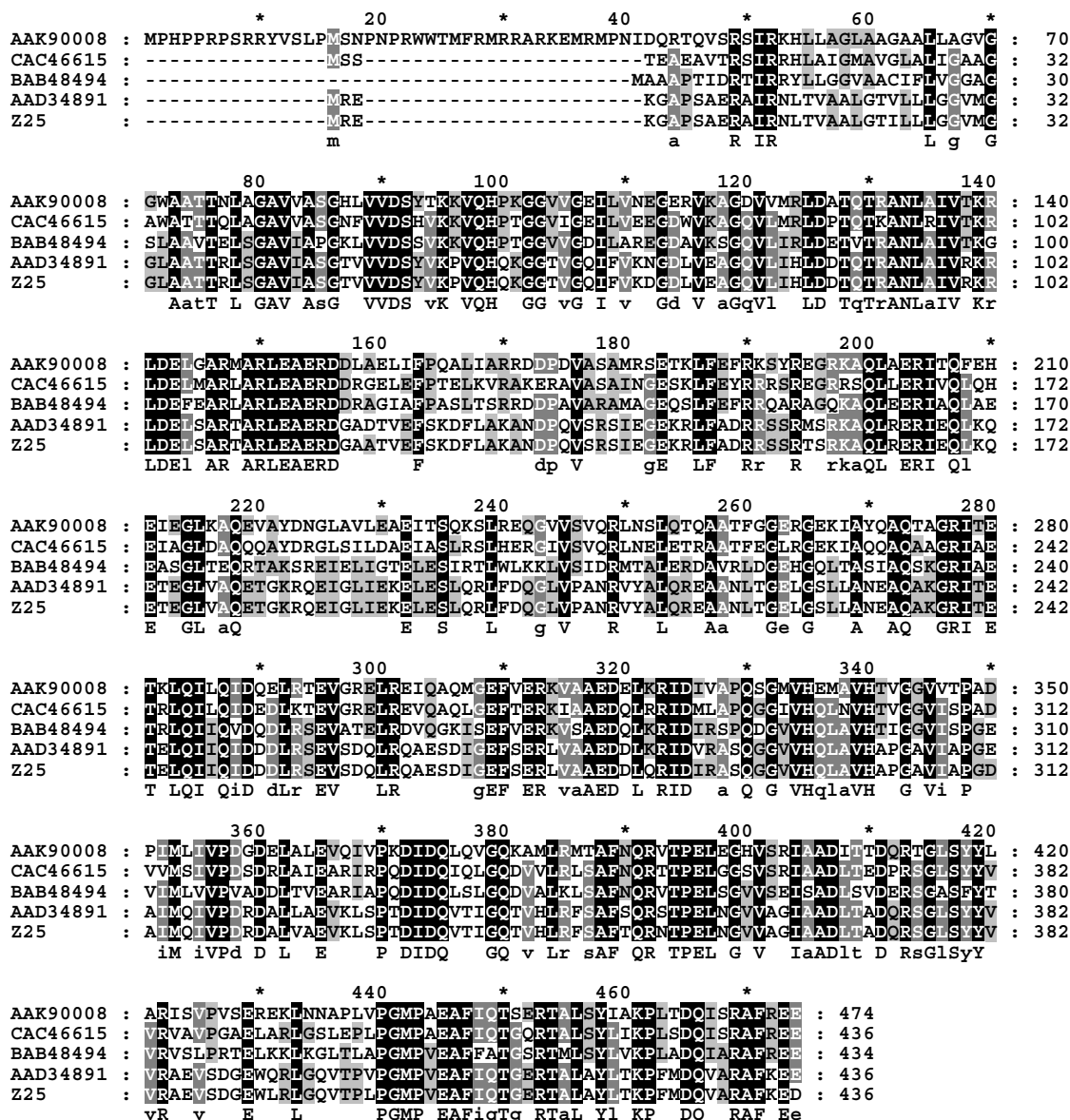


Figura 4.28: Alineamiento del ORF7 con secuencias de proteínas conocidas depositadas en bases de datos. AAK90008: RspE de *Agrobacterium tumefaciens* C58, CAC46615: Proteína transmembrana de secreción de toxina putativa de *Sinorhizobium meliloti* 1021, BAB48494: RspE de *Mesorhizobium loti* MAFF303099, AAD34891: RspE de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 162Y10, Z25: RzcE de

4.2.2.8. Análisis de RzcF

El alineamiento de la proteína RzcF (ORF8) se puede ver en la Figura 4.30.

```

      *           20           *           40           *           60           *
BAC47422 : MYMHVYVVKKCDRCVNRIAESYMSNAMLKSSCATPNLPPNAPFEDPCLSLAAKEVARLSILDGMRGIAAIC : 70
AAK23309 : -----MCLQGHQAGRRYEALDCLRGIAAIG : 25
AAD34892 : -MQHFDEERSGEERFRITADALPRSAFPAAAYSGP-----SVSQELCREGGQTKYRFIFLDELRLGLAALS : 63
Z25 : -MQHFDEERSGEERLQTTSDSVARSTFPAAAYPGP-----SDAODLCHGAGQAKRPFIFLDELRLGLAALS : 63
AAO77474 : -----MQKISSAFADSKPHYVLLDCLRGVAAALL : 29
                                     g                               LD LRG AA

      80           *           100          *           120          *           140
BAC47422 : VAVLHFFYEPQFQGPQNR-IPHCYLAVDFFFCLSGYVMFAFYP--SRVELSPTELIKRRLIRLHPLVVIC : 137
AAK23309 : VLLYHVGSL--WTGRPWLVPHCYLAVDFFFCLSGFVLAHANG---RRDITWLGFMQRQLVRLWPLIVLT : 88
AAD34892 : VVLLHASQISFRLN---SHSYLAVDFFFCLSGFVLANGYDQTLKSGALGSKAFFLKRVVRLVYPMIVAG : 129
Z25 : VVLLHASQISFRLN---SHSYLAVDFFFCLSGFVLANGYDQTLKSGALGSKAFFLKRVVRLVYPMIVAG : 129
AAO77474 : VIWYHVFEGSATSPIDQKFNHCYLAVDFFFCLSGFVIGYAYDR-WKTTMTQKEEFKRRLLIRLHPLMVVIC : 98
      V H f H YLAVDFFFCLSGfV a Yd f R RL P V g

      *           160          *           180          *           200          *
BAC47422 : SLGCFVVVVIGRFYAPMAAALFNFSVTEFFILLTCSVLLLPHLFVHDPSP-PIPFVAPAWSLLCEYVAS : 206
AAK23309 : MLGGAFVVIQNRREAVPGWLALG-----LLMIPRVWIDETGFSPLFPLNPPAWSLFFELAVG : 144
AAD34892 : VGLGVIASQVALTPRIALADVSILAVG-----ALLLLPLGLLVGQEA---FAINPLWSTICFEMVAS : 188
Z25 : VGLGVIASQVALTPRIALADVSILAVG-----ALLLLPLGLLVGQEA---FAINPLWSTICFEMVAS : 188
AAO77474 : AVLGATTFCIQCEQWDGTRVSIISMVMVAMLLNLFIPAVBGTGPEVRNGEMYPLNGESWSLFFEEYIGN : 168
      lG v P f n P WS fE

      220          *           240          *           260          *           280
BAC47422 : LTFALCLRQLSLRWLLAMLAFA-AVA TAYTCYDFG--SLNGGFDRR--TFWICFVRVGFSTIACVVACR : 270
AAK23309 : AAWFP-IRRLGVLGHVLLVLL-LPVMLYVAHGMG---GVLGWDRG--TFVISFLRTIFAFLLCWGCYR : 207
AAD34892 : VAYGCIARRRFHVWYETAALAL-LAAALFQVVMLEGAI GPVGFASWR--GFEGFIRVGFSTIACVLI FR : 255
Z25 : VAYGCIARRRFHVWYETAALAL-LAAALFQVVMLEGGIGPVGFASWR--AFLECFIRVGFSTIACVLI FR : 255
AAO77474 : ILYALFIRRMSTKALTILVVIAGIGLASFSICNLGSHHLLGVGWSMIDYNLIGCFRLRMLFAFSICLLMSR : 238
      Rr f gF R F F G R

      *           300          *           320          *           340          *
BAC47422 : IGRQPLLPGAAYLPIIMATFFWP-----FLWK--PYDLIVTIVYPLLWVIGAN-AIGSPSINRFSE : 331
AAK23309 : IQAFWTWTPVWALALLGAVVCAP-----WTPLNWLVDFACVSVVFLMLLAGRR-DPDG-LAAQVCR : 269
AAD34892 : WKIYHRVGAVPPQIPFMIHIAVLFPP-----FSVPNDIYDFICIAVIIPIVITLAAA-VPQS-AERPFVAV : 318
Z25 : WRIQRVGAAPPQIPFVLIHIAVLI PP-----FSVPNDIYDFICIAVIIPIVITLAAA-VPQS-AERPFVAV : 318
AAO77474 : LFKPVHIKGAFWICSLIILLTMDYVGGGETSPWMLGIYDAVCTILIFELLVYLGASGKTTDKGTAKICK : 308
      L l P n Ydf c P v l a

      360          *           380          *           400          *           420
BAC47422 : FIGDLSYPLVMTHYVPLMLLFGGTSAGW--VAQIHAALAVPSMTLVAIAFSLVKRYIDEPIRATLRRHS : 399
AAK23309 : AAGAISYPLVMALEHWLWELLRAYRALG--GEGYPAGFAITGVLLIVLG-SWVVLKVYDEPVRRIIRALG : 336
AAD34892 : YLCQISYPLVIVHLP-VIQLGNQFQNLIT--DGFMLAITVGGTFLVAVGVAFHLHGCFDAPLRAYLGRKF : 385
Z25 : YLCQISYPLVAVHLP-VIQFGDHFQNLIT--DGFIPLPVTVGGTLLVAVGVAFHLHGCFDAPLRAYLGRKF : 385
AAO77474 : FLGDISYPLVMIHYPFMYLFYAWLWSKEPHITFSQSWPVALCVFFGSIVLAYLCLKLYDEPVRKWLKSKF : 378
      G SYPLY H l D P R L

```

BAC47422 : FEHLKG : 405
 AAK23309 : T----- : 337
 AAD34892 : PLN--- : 388
 Z25 : PLN--- : 388
 AAO77474 : LTKK-- : 382

Figura 4.30: Alineamiento del ORF8 con secuencias de proteínas conocidas depositadas en bases de datos. BAC47422: Blr2157 de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110, AAK23309: Aciltransferasa putativa de *Caulobacter crescentus* CB15, AAD34892: RspF de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 162Y10, Z25: RzcF de *Rhizobium leguminosarum* Z25, AAO77474: Aciltransferasa de *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482. Sombreado: **C residuo 100% conservado, **C** residuo 80% conservado, **C** residuo 60% conservado.**

Al emplear el programa RPS-BLAST se obtuvieron alineamientos con dos dominios conservados (Tabla 4.21). El dominio pfam01757 corresponde a una familia de aciltransferasas. Este dominio se ha encontrado en muchas proteínas sin caracterizar de *Caenorhabditis elegans* y tiene una longitud de unos 300 aminoácidos. El dominio COG1835 corresponde a aciltransferasas predichas.

Tabla 4.21: Dominios conservados encontrados en el ORF8. Se indica el número de aminoácidos, la región con la que alinea, el porcentaje de alineamiento y el valor de E. A continuación se encuentra la secuencia del ORF8 en la que se indica en rojo la región que alinea con el dominio conservado pfam01757. Asimismo se muestran con subrayado punteado las hélices transmembrana predichas con SOSUI. Las hélices primarias están subrayadas en color naranja y las secundarias en color azul.

Nº de acceso	Dominio	Nº de aa	Posición	% de alineamiento	Valor de E
CDD25815, pfam01757	Acyl transf 3	327	50- 348	90,8%	2e-17
CDD11545, COG1835	Predicted acyltransferases	386	80- 387	82,9%	3e-10

```

1 MQHFDERSGEERLQTTSDSVARSTFPAAAYPGPSDAQDLGHGAGQAKRPF 50
51 IFLDELRLGLAALSVLLHASQIFSFRLNSHSYLAVDFFFCLSGFVLANGY 100
101 DOTLKSGALGSKAFFLKRVVRLYPMIVVGVGLGVIASQVALTPRIALADV 150
151 SILAVGALLILLPLGLLVGQEAFAINNPLWSICFEMVASVAYGCIARRRFH 200
201 FWYEIAAIALAAALFOVVMLEGGIGPVGFASWRAFLEGFIRVGFSFLAG 250
251 VLIFRWRIYQRVGAAPPQIPLFVLIAVLIPPFSVPNDIYDFICIAVIPI 300
301 VVALAAAVPOGAERPFAAYLQLSYPLYAVHLPVIQFGDHFONLTDGFIP 350
351 LPVTVGGTLLVAVGVAHFLHGCFDAPLRAYLGRKFPLN 388
    
```


En la Figura 4.31 se indica la estructura secundaria consenso de RzcF (ORF8).



Figura 4.31: Estructura secundaria consenso del ORF8. Hh: Hélice α , Ee: lámina β , Cc: *random coil* (bucle al azar), ?: estados ambiguos.

Según el programa SOSUI la proteína ORF8 es una proteína de membrana que posee 10 hélices transmembrana (Tabla 4.21), y según SOSUI (Signal) y SignalP 3.0 no tiene péptido señal. Según PSORT y PSORTb esta proteína probablemente está localizada en la membrana interna. No se han encontrado estructuras *coiled-coil*, HTH, ni cremalleras de leucinas. Con el programa Radar se ha observado la existencia de tres tipos de repeticiones (Tabla 4.22).

Tabla 4.22: Repeticiones encontradas en el ORF8 con el programa Radar.

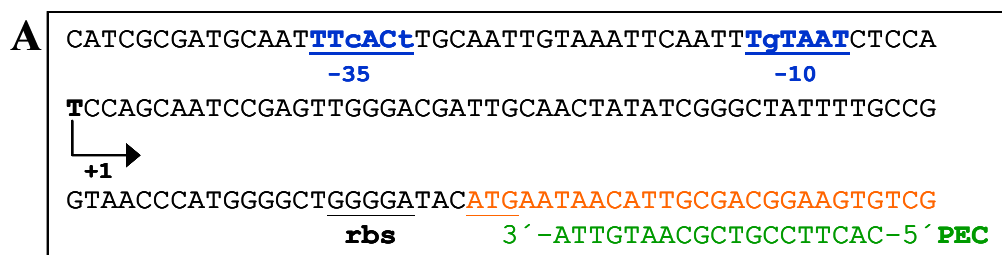
Posición	Repeticiones
99-154	G..YDQTLKSGAL.GSKAF....FLKR.VVRLYPMIVVGVGL..GVIASQVALTPRIALADVSI LA
161-212LPLGLLVGQEAFA....AINNpLWSICFEMVASVAY..GCIARR.RHFHFWEIAAIALLA
213-265	AaLFQVVMLEGGI.GPVGFaswraFLEG.FIR.....VGFSFlaGVLIIFRWRIYQRVGA.....
300-327	IVVALAAA..VPQGAERPFAAYLGQ1SYPL
359-387	LLVAVGVAhfLHGCFDAPLRAYLGR.KFPL
266-280	PPQIPLFVLI AVLIP
285-299	PNDIYDFICIAVIIIP

4.3. ANÁLISIS DE LA REGIÓN PROMOTORA DE LOS GENES *rzcC* Y *rzcA*

Una vez secuenciados y caracterizados los genes de la región responsable de la expresión de la bacteriocina, se procedió a la identificación del inicio de transcripción de los genes *rzcC* y *rzcA* mediante la reacción de extensión de cebador.

4.3.1. Identificación del inicio de transcripción del gen *rzcC*

Para identificar el inicio de transcripción del gen *rzcC*, se aisló ARN total de la cepa Z25 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, cultivada durante 24 horas en medio TY con agitación (150 r.p.m.). La reacción de extensión se realizó mediante el empleo de un oligonucleótido denominado PEC, que hibrida entre las posiciones 5925-5943 de la secuencia nucleotídica de la región de la bacteriocina. Se detectó un transcrito cuyo inicio corresponde a un nucleótido de T situado en la posición 5847 de la secuencia de la región de la bacteriocina, a 73 nucleótidos en dirección 3'-5' del posible inicio de traducción de *rzcC*. Asimismo se encontraron dos posibles cajas -10 y -35, que coinciden con la secuencia consenso de las cajas de Sigma-70 (Figura 4.32).



Consenso Sigma-70: [TTGaca] -N₁₅₋₁₇- [TAtaaT]

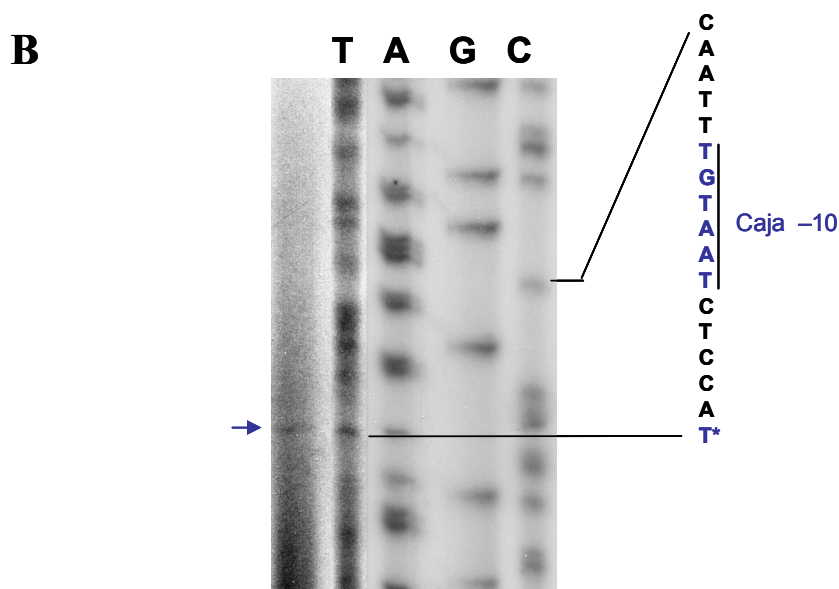


Figura 4.32: Análisis de la región promotora del gen *rzcC* mediante reacción de extensión de cebador. A: Secuencia de ADN de la región promotora del gen *rzcC* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* cepa Z25. El gen *rzcC* se ha indicado en color naranja y el inicio de traducción (ATG) con subrayado. También se ha señalado el posible lugar de unión al ribosoma (rbs) con subrayado, el cebador PEC en color verde y el inicio de transcripción (T) en negrita con un +1 debajo y con una flecha que indica la dirección de transcripción. Las posibles cajas -10 y -35 (Lacour y Landini, 2004) se han indicado en color azul y en negrita, y los fallos con respecto a la secuencia consenso están en minúscula. B: A la izquierda se encuentra el producto de extensión y a la derecha la reacción de secuenciación. La flecha azul indica la localización del transcrito detectado. La secuencia mostrada es la complementaria a la hebra secuenciada.

4.3.2. Identificación del inicio de transcripción del gen *rzcA*

Para identificar el inicio de transcripción del gen *rzcA* se aisló ARN total de la cepa Z25 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* cultivada en medio TY durante 24 horas con agitación (150 r.p.m.). La reacción de extensión se realizó mediante el empleo de un oligonucleótido denominado PEA, que hibrida entre las posiciones 7023-7040 de la secuencia nucleotídica de la región de la bacteriocina. Se detectaron dos transcritos, 1 y 2, que daban una señal débil. El transcrito 1 se inicia en un nucleótido de T situado en la posición 6978 de la secuencia de la región de la bacteriocina, a 12 nucleótidos en dirección 3'-5' del posible inicio de traducción de *rzcA*. El transcrito 2 se inicia en un nucleótido de C situado en la posición 6977 de la secuencia de la región de la bacteriocina, a 13 nucleótidos en dirección 3'-5' del posible inicio de traducción de *rzcA*. Asimismo se encontraron dos posibles cajas -10 superpuestas, que contienen cinco nucleótidos idénticos a los de la secuencia consenso de la caja -10 de Sigma-70 (TATAaT), aunque una de ellas podría tratarse de una caja -10 extendida ya que contiene ocho nucleótidos de la secuencia consenso 5'-TGNTATAAT-3' (Figura 4.33).

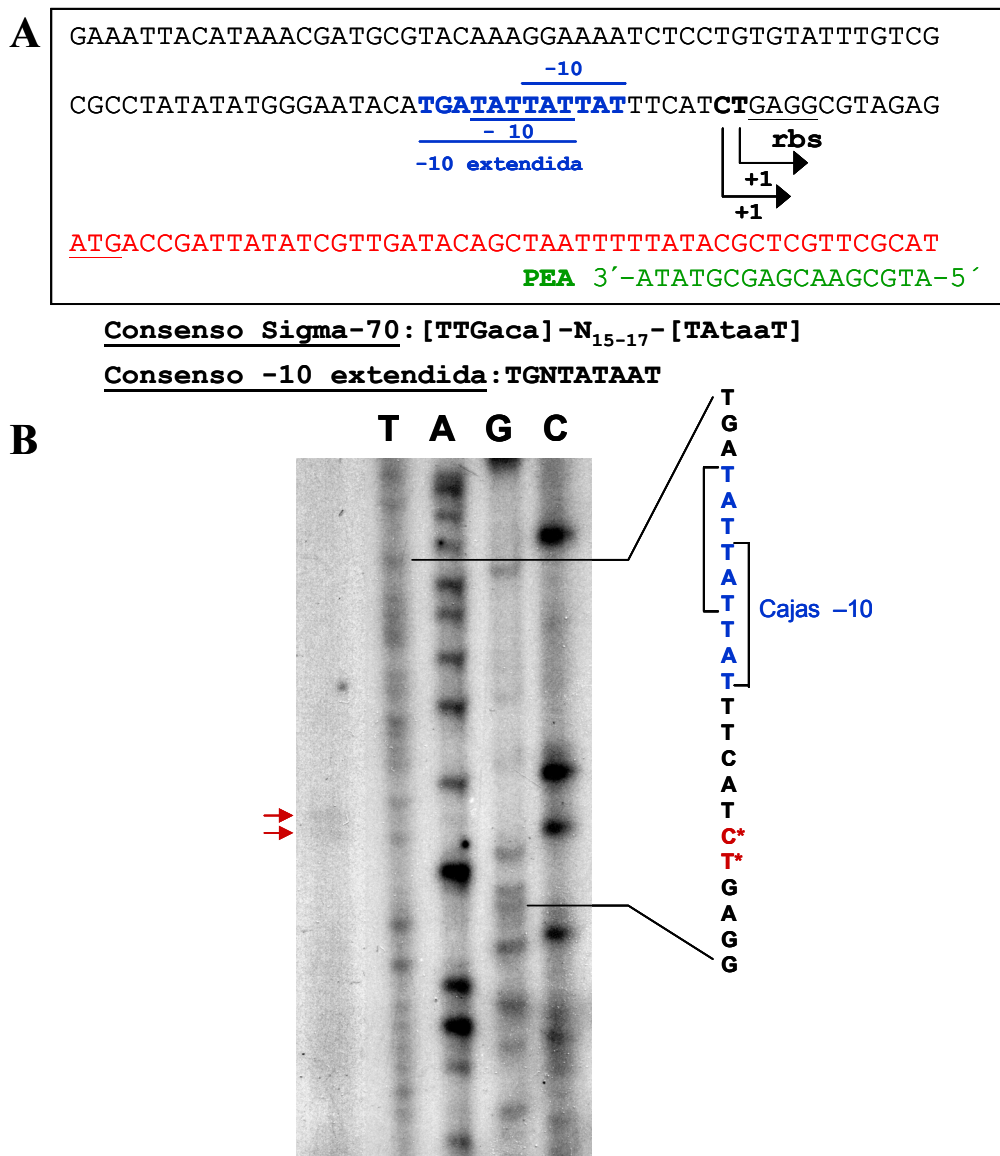


Figura 4.33: Análisis de la región promotora del gen *rzA* mediante reacción de extensión de cebador. A: Secuencia de ADN de la región promotora del gen *rzA* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* cepa Z25. El gen *rzA* se ha indicado en color rojo y el inicio de traducción (ATG) con subrayado. También se ha señalado el posible lugar de unión al ribosoma (rbs) con subrayado, el cebador PEA en color verde y los inicios de transcripción (C y T) en negrita con un +1 debajo y con una flecha que indica la dirección de transcripción. Las posibles cajas -10 y -10 extendida (Mitchell et al., 2003) se han indicado en color azul y en negrita. B: A la izquierda se encuentran los productos de extensión y a la derecha la reacción de secuenciación. Las flechas rojas indican la localización de los dos transcritos detectados. La secuencia mostrada es la complementaria a la hebra secuenciada.

4.4. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE ACIL HOMOSERINA LACTONAS POR *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* CEPA Z25

Antes de proceder al estudio de la posible implicación del mecanismo de percepción de quórum en la regulación de la producción de bacteriocina por la cepa Z25 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, se analizó la producción de AHLs por la cepa Z25 mediante ensayos en placa con *Chromobacterium violaceum* cepa CV026 y *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 pZLR4. Como cepa control se empleó la cepa A34 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Downie et al., 1985).

4.4.1. Ensayo en placa con *Chromobacterium violaceum* cepa CV026

Se realizó un ensayo en placa para la detección de las AHLs producidas por las cepas Z25 y A34 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* utilizando *Chromobacterium violaceum* CV026 como cepa indicadora. Alrededor de la cepa A34 se observó un halo de color violeta, lo que no ocurrió con la cepa Z25 (Figura 4.34). La cepa CV026 produce el pigmento violaceína como respuesta a AHLs de cadena corta y mediana (4-8 carbonos), por lo que la incapacidad de la cepa Z25 de activar la producción de violaceína por la cepa CV026 indica que la cepa Z25 no produce este tipo de AHLs, al menos a un nivel detectable por la cepa indicadora en las condiciones del ensayo.

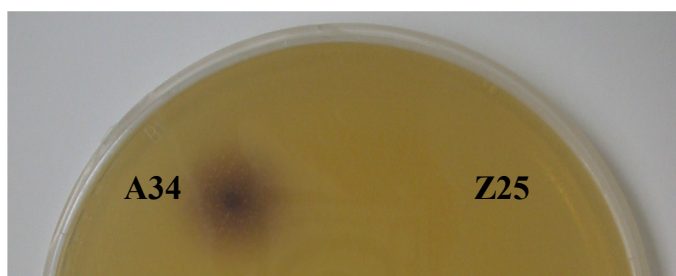


Figura 4.34: Ensayo de detección de AHLs en placa con *Chromobacterium violaceum* cepa CV026. A34: cepa A34 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, Z25: cepa Z25 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

4.4.2. Ensayo en placa con *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 pZLR4

Se llevó a cabo un ensayo en placa para la detección de la producción de AHLs por las cepas Z25 y A34 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* utilizando *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 pZLR4 como cepa indicadora. Alrededor de la cepa A34 se observó un halo de color azul con un diámetro de aproximadamente el doble del tamaño del halo que originó la cepa Z25 (Figura 4.35).

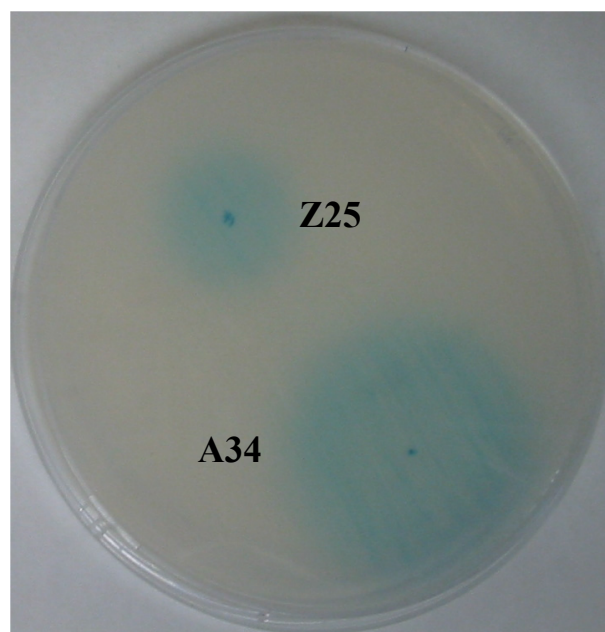


Figura 4.35: Ensayo en placa para la detección de AHLs con *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 pZLR4 como cepa indicadora. A34: cepa A34 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, Z25: cepa Z25 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

Una vez comprobado que la cepa Z25 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* producía AHLs, se procedió a la búsqueda de los genes *cinRI* en dicha cepa. En la cepa A34, los genes *cinRI* se encuentran en la cima de una cascada que controla la expresión de al menos otras tres AHL sintetas (Rodelas et al., 1999; Lithgow et al., 2000; Wisniewski-Dye et al., 2002).

4.5. CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS GENES *cinRI*, Y CONSTRUCCIÓN DE UNA MUTANTE DE LA CEPA Z25 EN EL GEN *cinI*

4.5.1. Amplificación de los genes *cinRI*

Para amplificar los genes *cinRI* de la cepa Z25 se llevó a cabo una PCR con unos cebadores diseñados a partir de la secuencia consenso obtenida del alineamiento de las secuencias de los genes *cinRI* de *Rhizobium leguminosarum* cepa 8401 (Nº de acceso AF210630) y *Rhizobium etli* cepa CNPAF512 (Nº de acceso AF393621). Para facilitar la clonación de los genes *cinRI* se incluyeron los sitios de restricción *NotI* y *XbaI* en los cebadores CIN1BNot y CIN2BXba. La secuencia de los cebadores, los parámetros de la reacción de PCR y los componentes de dicha reacción se muestran a continuación.

Cebadores:

CIN1BNot: cttgcgccgcGCCATGTCCTGCCAGCT

CIN2BXba: ggtctagaTCGGCATCATCACCTC

Programa:

- 95°C 2'
 - 4x 95°C 1'
 60°C 1'
 72°C 2,5'
 - 28x 95°C 1'
 69°C 1'
 72°C 2,5'
 - 72°C 10'

Componentes (µL):

- ADN cepa Z251
 - Tampón Pfu.....5
 - Oligonucleótido CIN1BNot0,2
 - Oligonucleótido CIN2BXba0,2
 - dNTPs.....1
 - Pfu Turbo ADN polimerasa1
 - Agua bidestilada.....42

4.5.2. Clonación y secuenciación de los genes *cinRI*

El producto de la anterior PCR, cuyo tamaño coincidió con el tamaño esperado de 2,2 kb, se dializó y a continuación se realizó una digestión con las enzimas *NotI/XbaI*. Se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa, y tras la tinción con bromuro de etidio se escindió la banda y se extrajo el ADN. El fragmento de ADN se ligó con el plásmido pBluescript II KS (-) y la ligación se transformó en células competentes de la cepa DH5 α de *E. coli*. Los clones se seleccionaron en placas de LB Ap con X-Gal e IPTG. A los clones resultantes se les extrajo el ADN plasmídico por lisis alcalina y se comprobaron por digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa para determinar el tamaño. El clon correcto recibió el nombre de pMAGR39 y se secuenció con los cebadores universal y reverso, así como con cebadores de diseño.

4.5.3. Estudio predictivo de los genes *cinRI*

La secuencia del fragmento amplificado por PCR tuvo una longitud total de 2,187 kb (Figura 4.36) con un porcentaje de G+C de 60,22%. Al analizarla se observó la existencia de dos posibles marcos abiertos de lectura ORF1 y ORF2 (Tabla 4.23), que se transcriben en la misma dirección.

Tabla 4.23: Posibles ORFs encontrados. Se indica la posición en la secuencia, el tamaño en pares de bases, el porcentaje de G+C y la hebra en la que se encuentra cada uno (+ directa, - complementaria).

ORF	Posición	Tamaño (pb)	G+C (%)	Hebra
ORF1	205-930	726	60,74	+
ORF2	1073-1738	666	60,36	+

Figura 4.36: Secuencia de nucleótidos de los genes *cinRI* amplificados por PCR en *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* cepa Z25. Se han indicado los siguientes genes: *cinR* en color azul y *cinI* en color rojo. Los codones de inicio de traducción se muestran en subrayado continuo, los codones de terminación en negrita, y los posibles sitios de unión a ribosoma en subrayado punteado. El posible sitio de inicio de transcripción (+1) de *cinR* según el programa BDGP *Neural Network Promoter Prediction* se ha indicado en negrita y con sombreado gris.

```

GCCATGTCCTGCCAAGCTGGATTTTCAGGCCCTTGGCGGCTGTTGGCATTTCGGCAATCTCGAATGGTCTCTTGCTGTCCA 80
TATGAGGTCTCCTCATGACAGGCGCTAGCAGATGGGGCCCGGATTGTCATTCCCCGCATATGTGGGGATGCCTTGATTTT 160
ATGACAGCGCTCGCGGTAGGATTGAGGGGATTGGGGCAGTGGAAATGATTGAGAATAACTACAGCGAAAAGTTCGAGTCC 240
GCTTTCGAACAGATCAAGGCTGCGGCCAATGTGGATGCCCCATCCGCATTCTCCAGGCGGAATATGGCCTCGATTTCGT 320
CACCTACCATCTCGCCAGACGATCGCGGCCAAGATCGATTCCGCCCTTCGTGCGCACCACCTATCCGGATGCCTGGGTCT 400
CCCGCTACCTCCTGAACAGCTATGTAAGGTCGATCCGATCGTCAAGCAGGGCTTCGAGCGGCAGCTGCCCTTCGACTGG 480
AGCGAGGTGAGCCGACGCGGAGGCCTATGCCATGTGGTTCGACGCCAGAACACGGTATCGGGCGCAACGGCTACTC 560
CATTCCCGTCGCGGACAAGGCGCAGCGCCGCGCTCTGTGCTGAATGCCCGCATAACGGCGGAAGAATGGGCCGAAC 640
TCGTCGCCCGTGCCTAACAAGTGGATCGAGATCGCCATCTCATCCACCGCAAGGCGTCTACGAGTGCACGGCGAG 720
AACGATCCGGTGCCTGCGGATTGTCGCCGCGGAGATCGAATGTCTGCATTGGACGGCGTGGGCAAGGATTACAAGGATAT 800
TTCGGTGATCTCGGCATATCGGAGCACACCACGCGGATTATCTGAAGACCGCCCGCTTCAAACCTCGGCTGCGCCACGA 880
TCTCGGCCGCCGCTTCGCGGGCCGTGCAATTGCGCATCATTAAATCCCTAGCGCATGGCGTTGTCGAAAACCGCTGCACA 960
CTTTCGCGCATATGCGCCCCCTCATCTGAGGGGGCCCATCTGAGGGAATTTCCGATCCGGCCCGCATGAACCATCTGC 1040
TCTCCACGAACCTGAAAACGCTGGAGGGCAAATGTTTCGTTATCATTTCAGGCACATGAGTATCAGAAATACGCTGCCGTA 1120
CTCGACCAGATGTTTCGCTGCGCAAGAAGGCTTTCGCCGATACGCTCGGCTGGGACGTTCCCGTCATCAGCCCTTACGA 1200
ACGCGACAGCTACGATTGCTCGCCCCAGCTTACCTCGTCTGGTGCACGATAGCCGCACCCGCTCTATGGCGGCATGC 1280
GCCTGATGCCGACAACCGGCCGACCTTCTCTACGACGCTTCCGCGAGACGTTTCCCGATGCCGCAATCTGATTGCC 1360
CCCGCATCTGGGAAGGCACGCGCATGTGCATCGACGAAGAGGCGATCGCCGAGGATTTCTCAATGTCGATGCCAGCCG 1440
CGCCTTCTCCATGATGCTGCTTGCCTTTGCGAATGCGCGCTCGATCAGGCATCCATACGATGATTTCCAATTACGAGC 1520
CCTACCTCAAGCGCTTACAAGCGCGCCGGCGCCGAAGTGAAGAAGTTCGGCCGTGCAGATGGCTACGGCAAATACCCC 1600
GTCTGCTGCGGCGCCTTCGAAGTATCGGACCGGGTGTGCGCAAGATGCGCGCCGCTTCGGCTCACCTACCCCTTTA 1680
TGTCAGGCACGTGCCGGCCGATCGGTGCTGACCCAATTCCTGGAGATGGCAGCATGAACCGCCTCGCTGAAACCGCCAC 1760
GCAGACCGCAATTCAGAAGGATATCGGCGCGCTGGAGCGCCATGTTCTCGCATCCCGCGACATCGCCACGCAGATAGGGG 1840
ATCCCTTCTCTCCTATCTCCTTTCGATGGCGCTGTTACAGATCTACGAGAAGAAGGCCATCACGAGAACGAGGCGCTG 1920
AAGAGCAGCTTCAGCTGAGGGTGTGGTTCCCTCCGCCCCGCTGAAGACGAGCATGTCTCCCGGCGCTCGCGCGCAGC 2000
CGCAAAAACAGTCCCGTTTTTTCGGCTGCGCGCCCTGTCCAGTCATCAGGGTATTGCCGTTACGTATCAGGGAATCGAT 2080
GGTCGAAATCAGCGTGTAGTGCATGTAGGGCTTCGGCAGGAAGGCGGTATTGGCGGGCAGCGCCATCGGATCGAGCCGCA 2160

```

CCATGCCCGAGGTGATGATGATGCCGA

2187

El primer ORF tiene el codón ATG como posible inicio de traducción, y el codón de terminación es TAG. Existen dos posibles sitios de unión a ribosoma de secuencia GAGGGGA y GGGG localizados a 15 y 9 pares de bases del codón ATG respectivamente. El contenido en G+C es del 60,74 %, consta de 726 pb, y codificaría para una proteína de 241 aminoácidos con un peso molecular estimado de 27253,12. Al comparar la secuencia de aminoácidos de este ORF con secuencias de proteínas depositadas en bases de datos con el programa BLASTP se observó que guarda la máxima similitud con el regulador transcripcional CinR del género *Rhizobium* (Tabla 4.24).

Tabla 4.24: Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos del ORF1 con otras secuencias de proteínas depositadas en bases de datos.

Especie bacteriana	Proteína	Nº de aminoácidos	% de identidad	% de similitud	Solapamiento	Nº de acceso
<i>Rhizobium leguminosarum</i> 8401	CinR	241	97	98	241	AAF89989
<i>Rhizobium etli</i> CNPAF512	CinR	241	95	98	241	AAL59595
<i>Rhizobium etli</i> CFN42	CinR	246	59	75	241	AAO43546
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	BisR	246	58	74	241	AAO21111
<i>Mesorhizobium</i> sp. BNC1	COG2771: proteínas de unión a ADN con dominio HTH	241	47	66	228	ZP_00194204
<i>Silicibacter</i> sp. TM1040	COG2771	239	30	50	236	ZP_00337734
<i>Rhizobium leguminosarum</i> 8401	RaiR	265	32	48	194	CAD20930
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1T	CerR	233	30	43	208	AAC46021
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	COG2771	260	31	48	224	ZP_00268559
<i>Ruegeria</i> sp. PR1b	RC109: regulador transcripcional putativo	258	26	47	236	AAN05182

El segundo ORF se encuentra a 143 nucleótidos del ORF1 en dirección 5'-3'. Tiene un codón ATG como posible inicio de traducción y una secuencia GGAGGG, situada a 5 pb del codón ATG, como posible sitio de unión al ribosoma. El codón de terminación es TGA. El contenido en G+C es de 60,36 %, se compone de 666 pb y codificaría para una proteína de 221 aminoácidos con un peso molecular estimado de 25031,10. Al comparar la secuencia de aminoácidos de este ORF con secuencias de proteínas depositadas en bases de datos con el programa BLASTP se observó que guarda la máxima similitud con las proteínas CinI de *Rhizobium leguminosarum* 8401 (97%) y *Rhizobium etli* CNPAF512 (97%) (Tabla 4.25).

Tabla 4.25: Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia de aminoácidos del ORF2 con otras secuencias de proteínas depositadas en bases de datos.

Especie bacteriana	Proteína	Nº de aminoácidos	% de identidad	% de similitud	Solapamiento	Nº de acceso
<i>Rhizobium leguminosarum</i> 8401	CinI	221	95	97	221	AAF89990
<i>Rhizobium etli</i> CNPAF512	CinI	221	93	97	221	AAL59596
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	Proteína hipotética conservada Atu5026	136	63	80	84	AAL45719
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1T	COG3916: Autoinductor sintasa	210	32	52	199	AAC46022
<i>Ruegeria</i> sp. PR1b	RC112 , TraI putativa	200	32	50	193	AAN05185
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	Autoinductor sintasa putativa	214	29	52	198	CAC46418
<i>Rhizobium etli</i> CNPAF512	RaiI	212	38	51	199	AAC38172
<i>Rhizobium leguminosarum</i> 8401	RaiI	212	39	51	186	CAD20929
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	TraI	213	32	49	202	BAB52447
<i>Mesorhizobium loti</i> R7A	Probable proteína de síntesis de autoinductor	210	30	49	202	CAD31578

En las siguientes tablas (Tabla 4.26 y Tabla 4.27) se muestran algunas características de las proteínas codificadas por los genes anteriores, basándose en los análisis del programa DNASTar.

Tabla 4.26: Número de aminoácidos (aa) totales y de aminoácidos básicos (K, R), ácidos (D, E), hidrofóbicos (A, I, L, F, W, V) y polares (N, C, Q, S, T, Y).

Proteína	Aa totales	Aa básicos	Aa ácidos	Aa hidrofóbicos	Aa polares
CinR	241	28	31	97	54
CinI	221	25	27	84	47

Tabla 4.27: Peso molecular, punto isoeléctrico y carga a pH 7.

Proteína	P molecular (Da)	pI	Carga a pH 7
CinR	27253,12	6,458	-1,984
CinI	25031,10	6,349	-1,586

El alineamiento de la proteína CinR (ORF1) se puede ver en la Figura 4.37.

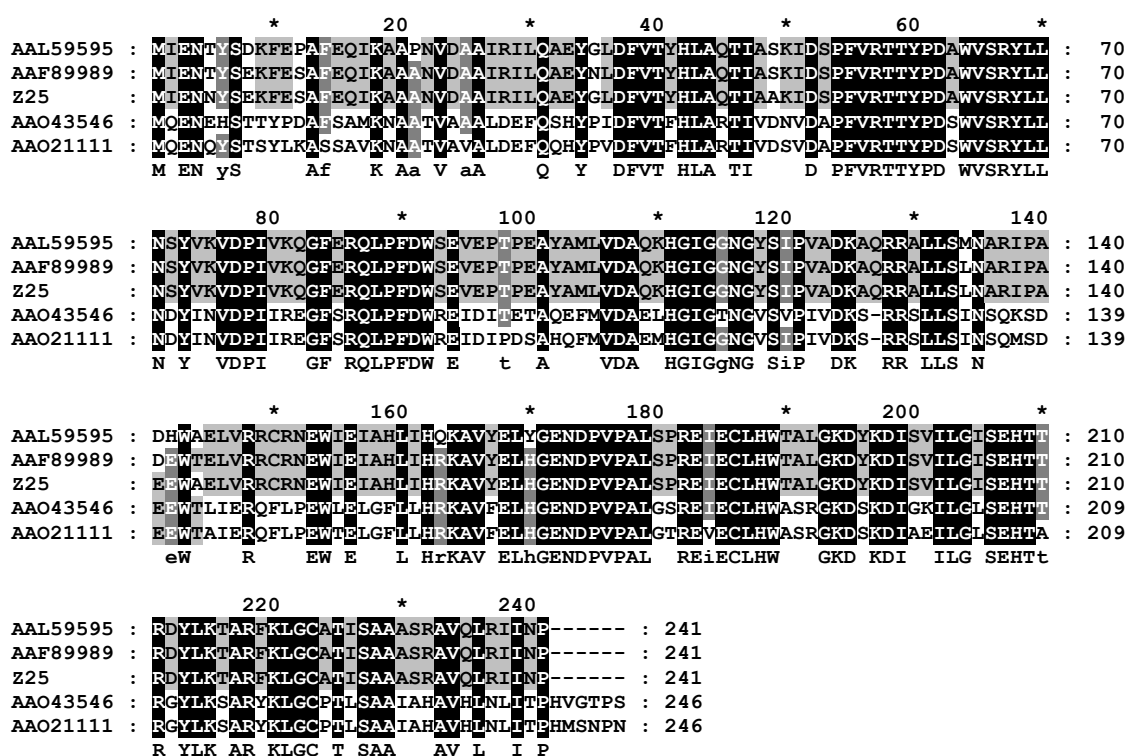


Figura 4.37: Alineamiento del ORF1 con secuencias de proteínas conocidas depositadas en bases de datos. AAL59595: CinR de *Rhizobium etli* CNPAF512, AAF89989: CinR de *Rhizobium leguminosarum* 8401, Z25: CinR de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Z25, AAO43546: CinR de *Rhizobium etli* CFN42, AAO21111: BisR de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Sombreado: ■ residuo 100% conservado, ■ residuo 80% conservado, ■ residuo 60% conservado.

Al emplear el programa RPS-BLAST se obtuvieron alineamientos con varios dominios conservados. En la Tabla 4.28 se indican los dominios de cada familia que dieron alineamientos con valores más bajos de E. El dominio smart00421 corresponde al dominio hélice vuelta hélice (HTH) del regulón Lux, que activa el operón de la bioluminiscencia. El dominio pfam03472 corresponde al dominio de unión a autoinductor, que se encuentra en una gran familia de reguladores transcripcionales y que se une específicamente a moléculas de autoinductor. El dominio COG2771 se encuentra en proteínas de unión a ADN que poseen un dominio hélice vuelta hélice.

pesar de no obtener una puntuación significativa, coincide con la región que alinea con el dominio smart00421.

El alineamiento de la proteína CinI (ORF2) se puede ver en la Figura 4.39.

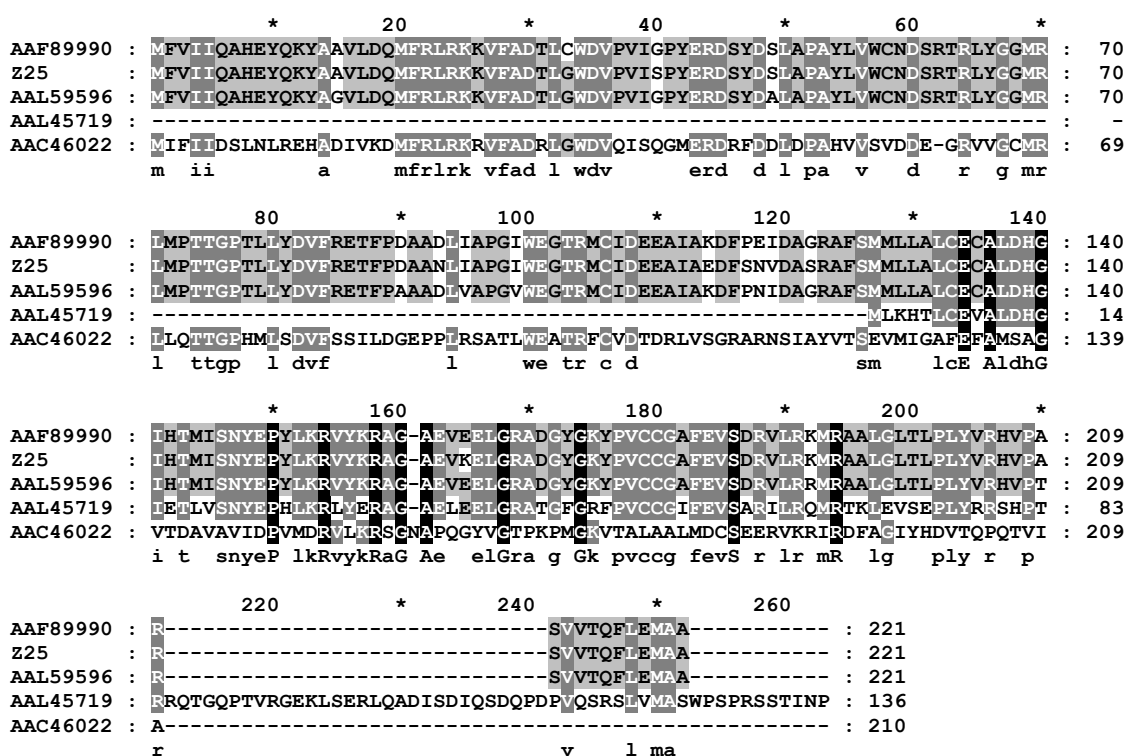


Figura 4.39: Alineamiento del ORF2 con secuencias de proteínas conocidas depositadas en bases de datos. AAF89990: CinI de *Rhizobium leguminosarum* 8401, Z25: CinI de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Z25, AAL59596: CinI de *Rhizobium etli* CNPAF512, AAL45719: Proteína hipotética conservada Atu5026 de *Agrobacterium tumefaciens* C58, AAC46022: Autoinductor sintasa de *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1T. Sombreado: ■ residuo 100% conservado, ■ residuo 80% conservado, ■ residuo 60% conservado.

Al emplear el programa RPS-BLAST se obtuvieron alineamientos con dos dominios conservados (Tabla 4.29). Ambos dominios conservados corresponden a la proteína autoinductor sintetasa o N-acil-L-homoserina lactona sintetasa.

Tabla 4.29: Dominios conservados encontrados en el ORF2. Se indica el número de aminoácidos, la región con la que alinea, el porcentaje de alineamiento y el valor de E. A continuación se encuentra la secuencia del ORF2 en la que se indica en rojo la región que alinea con el dominio conservado COG3916.

N° de acceso	Dominio	N° de aa	Posición	% de alineamiento	Valor de E
CDD6228, pfam00765	Autoind_synth	182	10-186	95,1%	8e-24
CDD13227, COG3916	LasI	209	1-205	96,7%	3e-32

```

1 MFVIIQAHEYQKYAAVLDQMFRRLRKKVFADTLGWDVPVISPYERDSYDSL 50
51 APAYLVWCNDSRTRLYGGMRLMPTTGPTLLYDVFRETFFDAANLIAPGIW 100
101 EGTRMCIDEEAIAEDFSNVDASRAFSMMLLALCECALDHGIHTMISNYEP 150
151 YLKRVKRAGAEVKELGRADGYGKYPVCCGAFEVSDRVLKRMRAALGLTL 200
201 PLYVRHVPARSVVTQFLEMAA 221
    
```

En la Figura 4.40 se indica la estructura secundaria consenso de CinI (ORF2).

```

          10      20      30      40      50      60      70
CinI      MFVIIQAHEYQKYAAVLDQMFRRLRKKVFADTLGWDVPVISPYERDSYDSLAPAYLVWCNDSRTRLYGGMR
Sec.Cons. ceeeec?chhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhccccccccc?cccccccccccccccccccccccccccccccccc
          80      90      100     110     120     130     140
CinI      LMPTTGPTLLYDVFRETFFDAANLIAPGIWEGTRMCIDEEAIAEDFSNVDASRAFSMMLLALCECALDHG
Sec.Cons. ecccccc?h?hhhhhhcccchhh?ccccccccccc?hhhhhhhhccc?hhhhhhhhhhhhhhhhhhccc
          150     160     170     180     190     200     210
CinI      IHTMISNYEPYLKRVKRAGAEVKELGRADGYGKYPVCCGAFEVSDRVLKRMRAALGLTLPYVRHVPAR
Sec.Cons. c?eeccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
          220
CinI      SVVTQFLEMAA
Sec.Cons. ???hhhhhhcc
    
```

Figura 4.40: Estructura secundaria consenso del ORF2. Hh: Hélice α , Ee: lámina β , Cc: random coil (bucle al azar), ?: estados ambiguos.

Según el programa SOSUI la proteína ORF2 es una proteína soluble, y según SOSUI (Signal) y SignalP 3.0 no tiene péptido señal. Según PSORT y PSORTb es una proteína citoplasmática. No se han encontrado estructuras *coiled-coil*, HTH, cremalleras de leucinas, ni repeticiones.

4.5.4. Construcción de la mutante *Z25-cinI*

Una vez conocida la secuencia de los genes *cinRI* de la cepa *Z25* se llevó a cabo un análisis de los sitios de restricción del gen *cinI* que fueran únicos en toda la secuencia del plásmido pMAGR39. Se escogió un sitio *SphI* para construir una mutante en *cinI* por inserción de un gen de resistencia a la gentamicina. Para esto, se realizó una digestión del plásmido pMAGR39 con *SphI*, se convirtieron los extremos cohesivos en romos gracias a la enzima de Klenow y se ligó con un fragmento *SmaI* de 0,86 kb que contenía el gen de resistencia a la gentamicina. La ligación se transformó en células competentes de la cepa DH5 α de *E. coli* y a continuación se seleccionó en una placa de medio LB Ap Gm. A los clones resultantes se les extrajo el ADN plasmídico por lisis alcalina y se comprobaron por digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa. El clon correcto recibió el nombre de pMAGR46. El gen de resistencia a la gentamicina se obtuvo mediante la digestión del plásmido pUCGM con la enzima *SmaI*, seguida de una electroforesis en gel de agarosa. Tras teñir el gel con bromuro de etidio, se escindió la banda de 0,86 kb y se extrajo el ADN.

El plásmido pMAGR46 se digirió con la enzima *NotI* y los extremos cohesivos se hicieron romos gracias a la enzima de Klenow. A continuación se digirió con *SmaI* y se ligó con el plásmido pK18*mobsacB* digerido con *SmaI*. La ligación se transformó en células competentes de la cepa DH5 α de *E. coli* y a continuación se seleccionó en una placa de medio LB Km Gm. A los clones resultantes se les extrajo el ADN plasmídico por lisis alcalina y se comprobaron por digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa. El clon correcto recibió el nombre de pMAGR49. Con la ayuda de este plásmido se realizó una recombinación doble en la cepa *Z25* (ver Material y Métodos, apartado 3.2.14), y se obtuvo la mutante *Z25-cinI* (Figura 4.41).

4.5.5. Comprobación de la mutante Z25-*cinI*

Para comprobar las posibles mutantes *cinI* de la cepa Z25 se realizó una amplificación por PCR con los mismos oligonucleótidos que se usaron para amplificar los genes *cinRI* (Cin1BNot y Cin2BXba) y como ADN molde se empleó el producto de la lisis celular de una colonia. Como control negativo se realizó la misma reacción con ADN genómico de la cepa Z25. Los parámetros de la reacción de PCR y los componentes dicha reacción se muestran a continuación.

Programa:

- 95°C 7'
- 4x 95°C 1'
- 60°C 1'
- 72°C 2,5'
- 28x 95°C 1'
- 69°C 1'
- 72°C 2,5'
- 72°C 10'

Componentes (µL):

- Producto de lisis 4
- Tampón 5
- MgCl₂ 3
- DMSO 2,5
- dNTPs 1
- Albúmina 1
- Oligonucleótido Cin1BNot 0,2
- Oligonucleótido Cin2BXba 0,2
- Taq Gold 0,2
- Agua bidestilada 32,8

El producto de la PCR en la que el ADN molde era el producto de la lisis celular de la posible mutante en el gen *cinI* tuvo un tamaño de aproximadamente 3 kb, lo que corresponde a la suma de los tamaños del fragmento que contiene los genes *cinRI* (2,187 kb) y del gen de resistencia a la gentamicina (0,86 kb). El producto de la PCR en la que el ADN molde era el ADN genómico de la cepa Z25 tuvo un tamaño de aproximadamente 2,2 kb, lo que coincide con el tamaño del fragmento que contiene los genes *cinRI* (2,187 kb) (Figura 4.41).

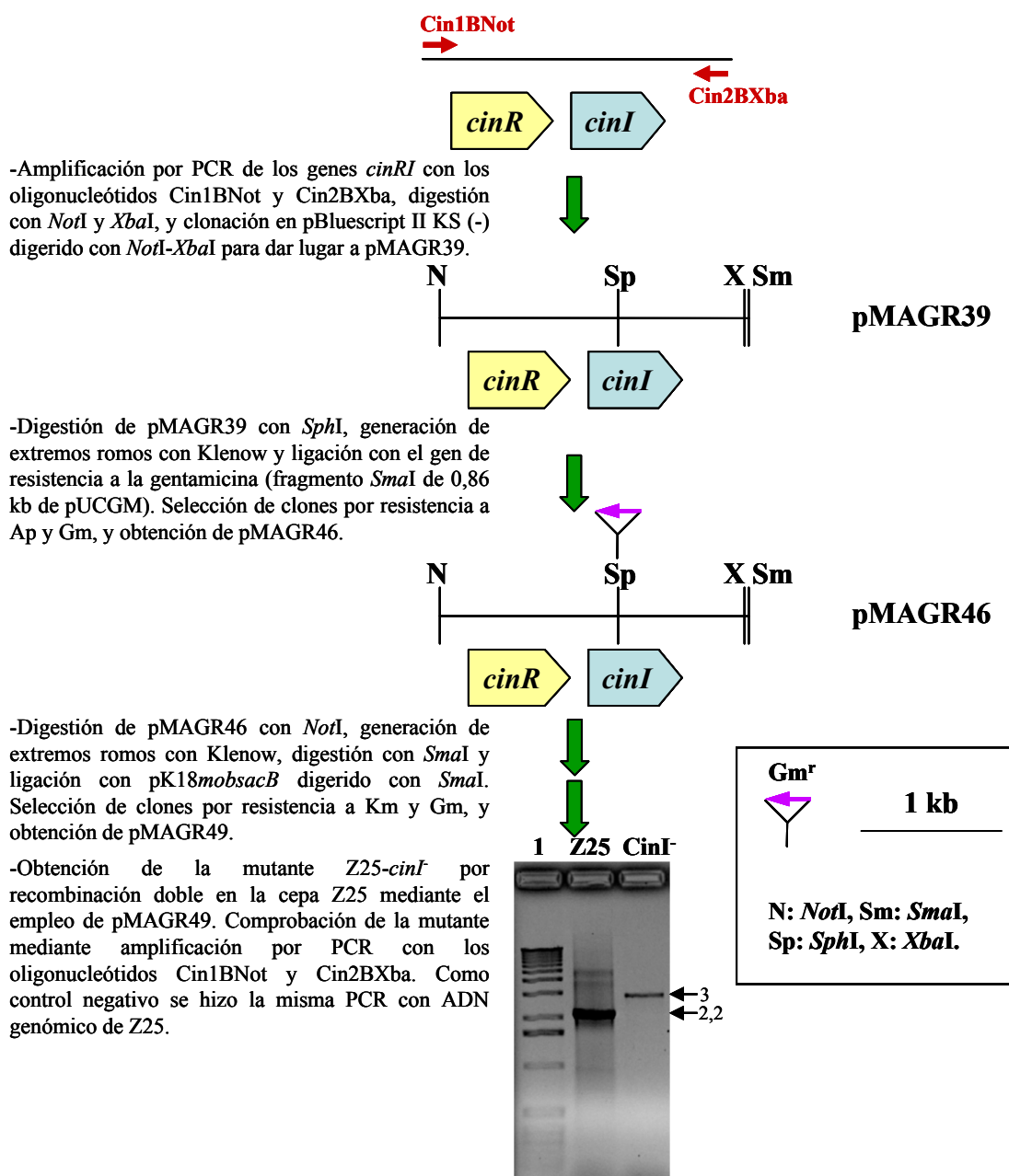


Figura 4.41: Estrategia para la construcción de una cepa mutante en el gen *cinI*. Se indican los oligonucleótidos con flechas de color rojo. 1: escalera de 1 kb, Z25: producto de la PCR empleando como ADN molde el ADN genómico de la cepa Z25, CinI: producto de la PCR empleando como ADN molde el producto de la lisis celular de una colonia de la mutante *Z25-cinI*. Las flechas indican el tamaño en kb de los productos de PCR.

4.6. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE ACIL HOMOSERINA LACTONAS POR LA CEPA Z25 Y LA MUTANTE Z25-*cinI*

4.6.1. Ensayo en placa para la detección de AHLs con *Chromobacterium violaceum* cepa CV026 y *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 pZLR4 como cepas indicadoras

Se realizó un ensayo en placa para la detección de la producción de AHLs por las cepas Z25, Z25-*cinI* y A34 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* empleando *Chromobacterium violaceum* CV026 como cepa indicadora. Alrededor de la cepa A34 se observó un halo de color violeta, lo que no ocurrió con ninguna de las demás cepas de *Rhizobium* (Figura 4.). El objetivo de este ensayo fue comprobar si el perfil de la cepa Z25-*cinI* en este ensayo tenía alguna diferencia con respecto a la cepa parental.

Asimismo se llevó a cabo un ensayo en placa para la detección de la producción de AHLs por las cepas Z25, Z25-*cinI* y A34 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* utilizando *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 pZLR4 como cepa indicadora. Como ya se había observado anteriormente alrededor de la cepa A34 se formó un halo de color azul cuyo diámetro era el doble del tamaño del halo azul que se había formado alrededor de la cepa Z25. Sin embargo, el halo alrededor de la cepa Z25-*cinI* tenía un diámetro mucho menor (Figura 4.42), mostrando la reducción en la producción de AHLs en la mutante Z25-*cinI*.

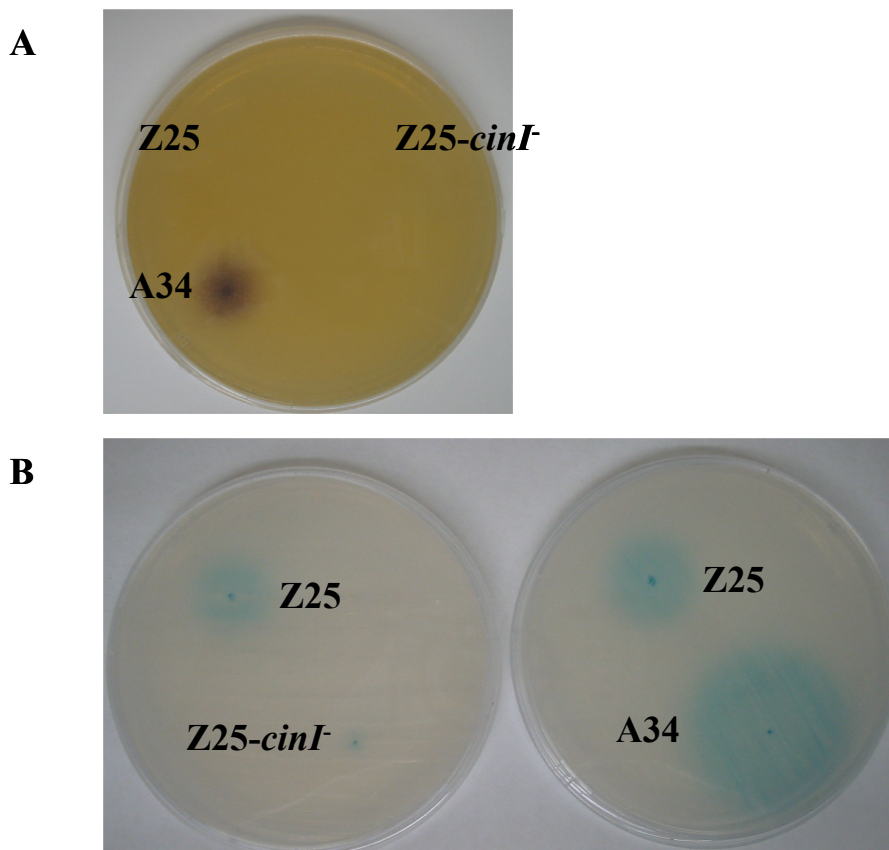


Figura 4.42: A: Ensayo en placa para la detección de AHLs con *Chromobacterium violaceum* CV026 como cepa indicadora. B: Ensayo en placa para la detección de AHLs con *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 pZLR4 como cepa indicadora. A34: cepa A34 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*; Z25: cepa Z25 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*; Z25-cinI: mutante de la cepa Z25 en el gen *cinI*.

4.6.2. Análisis de extractos de AHLs mediante cromatografía en capa fina

Se prepararon extractos de AHLs de las cepas Z25, Z25-cinI y A34 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, tal y como se describe en el apartado 3.5.2. En la placa de cromatografía en capa fina se aplicaron diferentes cantidades de los extractos anteriores, equivalentes a 150 μ L y 200 μ L de cultivo de la cepa Z25-cinI, 100 μ L y 150 μ L de cultivo de la cepa Z25 y 30 μ L de cultivo de la cepa A34. Asimismo se aplicaron AHLs

estándar: C₆-HSL (804 pmoles) y C₈-HSL (31,6 pmoles). A continuación se llevó a cabo la cromatografía en capa fina y el revelado con el organismo indicador *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 pZLR4. En el caso de la cepa Z25 se detectaron un mínimo de cinco moléculas inductoras, algunas de las cuales migraron a la altura de las AHLs estándar de cadena corta (C₆ y C₈). No obstante, en la mutante Z25-*cinI* se observó una disminución de la producción o total desaparición de cuatro de las AHLs detectadas (Figura 4.43).

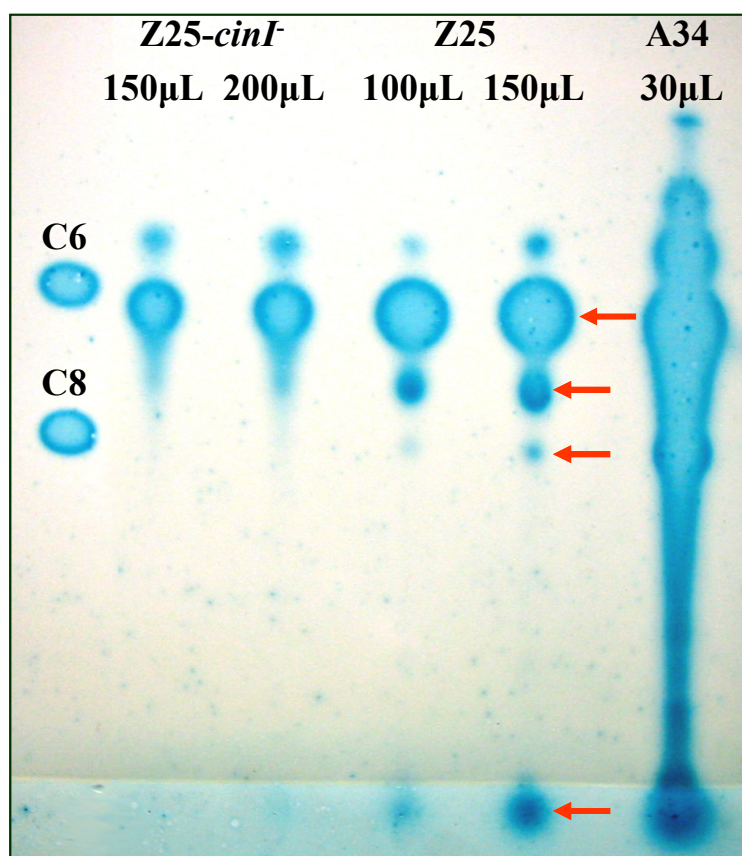


Figura 4.43: Perfil de AHLs obtenido por cromatografía en capa fina de extractos del sobrenadante de cultivos de 24 horas de la cepa Z25 y de la mutante Z25-*cinI*. Como controles se han empleado una mezcla de AHLs sintéticas (C₆-HSL y C₈-HSL) y el extracto de la cepa A34. En cada calle se indican los microlitros de medio de cultivo correspondientes al volumen de extracto cargado. Las flechas rojas indican las AHLs que disminuyen o desaparecen en la cepa Z25-*cinI*.

4.6.3. Ensayo de producción de bacteriocinas por la cepa Z25-cinI

Se llevó a cabo un ensayo de producción de bacteriocinas por las cepas Z25 y Z25-cinI mediante la técnica de antagonismo diferido (apartado 3.2.11), y se observó que en la mutante Z25-cinI el halo era de menor tamaño que en el caso de la cepa Z25 (Figura 4.44). Este experimento se repitió seis veces y en todos los casos se observó una disminución de un $19,45 \pm 4,98\%$ (intervalo de confianza del 95%) en el tamaño del halo con respecto a la cepa Z25. Esto parece indicar que la mutación en el gen *cinI* disminuye la liberación de la bacteriocina.

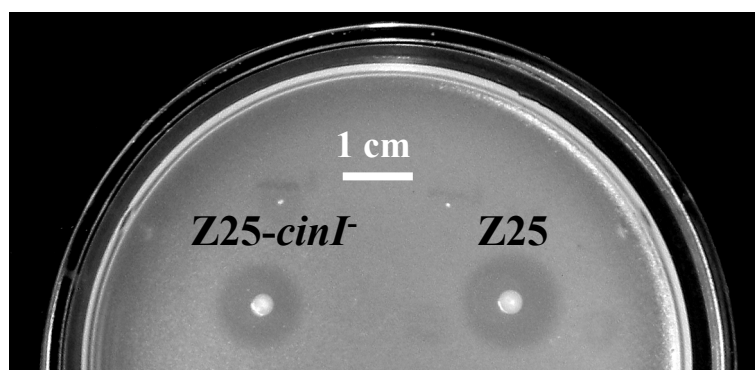


Figura 4.44: Ensayo de producción de bacteriocina por las cepas Z25 y Z25-cinI.

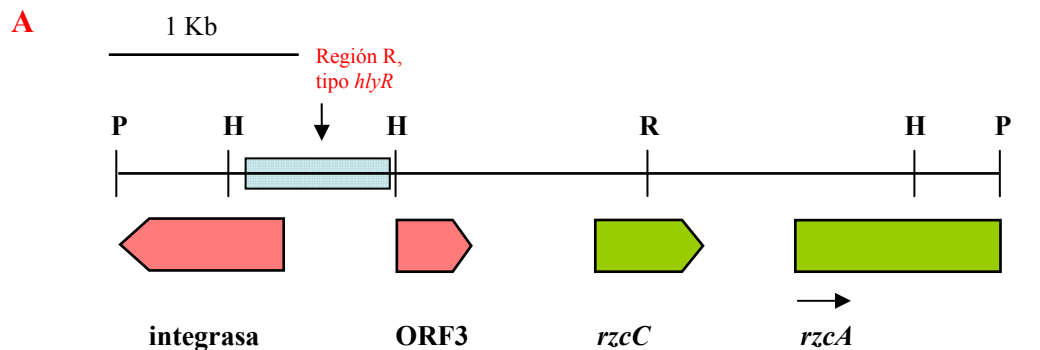
4.7. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA DE FUSIONES TRANSCRIPCIONALES DE LOS GENES *rzcC*, *rzcA*, *rzcD* Y ORF3 CON EL GEN *lacZ*

Tras comprobar mediante la reacción de extensión de cebador la existencia de dos promotores en las regiones que flanquean en 5' a los genes *rzcC* y *rzcA* (ver apartado 4.3), se procedió a la construcción de fusiones *lacZ*, con el fin de estudiar la expresión de dichos genes mediante la medida de la actividad β -galactosidasa. Para ello se escogió como herramienta el plásmido pMP220, vector de bajo número de copias (2-4 por célula), de rango amplio de hospedador, y que contiene el gen *lacZ* carente de promotor (Spaink et al. 1987). Este vector ha sido empleado con mucha frecuencia en el estudio de la expresión de genes de *Rhizobium* (Rodelas et al., 1999; Lithgow et al., 2000).

4.7.1. Construcción de fusiones transcripcionales de los genes *rzcC*, *rzcA*, *rzcD* y ORF3 con el gen *lacZ*

Como se ha expuesto en el apartado 1.3 de la Introducción, las toxinas RTX cuya regulación ha sido estudiada con detalle muestran una gran complejidad de la región promotora, con control de elementos reguladores en *cis* y en *trans*. En el caso de los genes *rzc* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* cepa Z25, se ha observado la presencia en las regiones promotoras de los genes *rzcC* y *rzcA* de una zona de ADN que guarda identidad (Figura 4.45) con el elemento regulador *hlyR* (698 nt) descrito para el operón *hly*, responsable de la producción y secreción de hemolisina en *Escherichia coli*. Por esta razón, se construyeron fusiones *lacZ* que incluyeran o excluyeran dicha región, con el fin de determinar la influencia de su presencia o ausencia sobre los niveles de actividad β -galactosidasa. Asimismo, se construyó una fusión del ORF3 para determinar si había expresión determinada por su zona promotora.

Figura 4.45: Zona de la región promotora de los genes *rzcC* y *rzcA* que guarda identidad con el elemento regulador *hlyR* del operón *hly* de *Escherichia coli*. A: localización de la región R. B: alineamiento. Número de acceso EMBL: *hlyR*, X07565.



B
Región R (46% identidad con *hlyR*)

región 1	AAACTGTCTGGTTCAAGGCCGGCCATGATAGGCCCGATGAGACCAGATGCACCTGAAACG	60
<i>hlyR</i>	GAATT--CCAAGCGAAGTCCATCCCCCTCCCTCTTGATTACAAGGGTGATAATTATTATT	58
	* *	
región 1	CGGCACGTCTTCCAGTCCAAGACGGTCTGGCGATCGCCGAAATAGCGCGAGAACTTCG	120
<i>hlyR</i>	CGCATTTGTGTGGTAAT--GGGATAGAAAAGG-AATGGATAGAAAAAGAACAAAA---TTA	112
	* *	
región 1	TCACCGCATGCAAAATACGATCGTTGCGTCGCTGGCGAAAAGATTGCGGATCGTCATGTCAT	180
<i>hlyR</i>	GTATAGCA-ATAGATATGCCACTGCATG-----ATACTTACAGGGCATTATTTTAT	165
	* *	
región 1	CGATCATGCGCCGGCTAGCGGGCTTATCTCTGTCATCGTCATCTCCTGTTCAAAGGTCG	240
<i>hlyR</i>	TATGTTTAAATTGA---AGTGGTCTCTGGTTTGAT----TTATTTGTTATTC AAGGGGCG	218
	* *	
región 1	GGCTAAAACAGCCCAATCCTTCAAATCAGAAGCGCATCATGCAATCCC GCGCTCCAAATG	300
<i>hlyR</i>	TGTTTGGAGATCGGAAAATCTGTACGTTAAGTGTATTATTTAA--CCAGTTTCGATGCG	276
	* *	
región 1	CGCGATAGCGGCTTCGTTCAATCTTCTCAGACAGTATTTGCTCTCTGGCTGGTTGC	360
<i>hlyR</i>	TAAC-AGATTGATTTTGCTCAGCGGTTATC-GCTTTTAAAGTTGTGCTCTTGGCTATCGC	334
	* *	
región 1	GCTGGTGGTATTCG--TAAAGCGGTTGGTAGCAAAAA-----ACAGCATGATCGTAGCT	412
<i>hlyR</i>	GTTTAGGTTATCCGATTAAGTCAAATTCCTGAAAATGCTGTATAGCGGGGAGTGCAC	394
	* *	
región 1	CGCG-AGCCATGAGCAGGTTCCGGTTTGGAGTCCGACTACCCGTTCCGATACCTCTGGG	471
<i>hlyR</i>	CTTATAGCTGTAGGTAAGTAT-GTTCAAAAAATAGTCTTGCCGTACAATA-ATTTTCCAT	452
	* *	
región 1	AGTTACTGGAATCCC GCGAGTTTCTTCTGGGGTGCATAAACGTTGGCATCGGTCCAGGT	531
<i>hlyR</i>	ATCCAAACTCACTCCTTCAAGATTCT----GGTCCCGGTTTACGGGTAGTT-TCCGGAA	506
	* *	
región 1	CGGCAGGAGTGGACTGAGTCAGAAACAGCGAACGCTTGC GCGGATTCCGGTCAGGTCGCTA	591
<i>hlyR</i>	GGGCGGTAGCATGCTGATTCA--AACTGCAAGATGAAACATTGTCGGAGTTGGAT-GGAA	563
	* *	
región 1	TCGTGACGACGCTCCC GCCATCGTGCGAAGTTGCAATGAGCTGCTTTCCGCTCAGTGAC	651
<i>hlyR</i>	TTAAGTCATGGCTATAGCATTTGGGCG----TGCA--TAACAAAATTGGTCTCA----T	613
	* *	
región 1	CCTCTAAGAGGTGACTTGCGAAATCCTTAAGAGTGTATTTAATCTTCTTGCCCAACCACT	711
<i>hlyR</i>	ATTTTAGAGTATGA-TTGCATATTCATAA---TATTTTAA---CTTTCTGATGCGTGGT	666
	* *	
región 1	GGGTGAGGGGATGATTATGCTCAAGATCGTGG	744
<i>hlyR</i>	GGCATCATGCTTTATGAGATAAACAATCCTGG	698
	* *	

4.7.1.1. Construcción de dos fusiones transcripcionales *rzcC-lacZ* (pMAGR20 y pMAGR29)

Se construyeron dos fusiones transcripcionales del gen *rzcC* con el gen *lacZ*: pMAGR20 y pMAGR29. La fusión pMAGR29 abarca la región R, que guarda identidad con el elemento *hlyR*, mientras que la fusión pMAGR20 la excluye. Para construir el plásmido pMAGR20, se clonó un fragmento *EcoRI-KpnI* de 1,4 kb del plásmido pMAGR18 (que contiene parte del ORF3 y la región promotora del gen *rzcC*) en el plásmido pMP220 digerido con *EcoRI-KpnI*. En el caso del plásmido pMAGR29 se clonó un fragmento *KpnI-XbaI* de 2,8 kb del plásmido pMAGR25 (que contiene parte del gen de la transposasa, el gen de la integrasa, el ORF3 y la región promotora del gen *rzcC*) en el plásmido pMP220 digerido con *KpnI-XbaI* (ver mapas de la figuras 3.1 y 3.2).

4.7.1.2. Construcción de tres fusiones transcripcionales *rzcA-lacZ* (pMAGR21, pMAGR17 y pMAGR16)

Se construyeron varias fusiones transcripcionales del gen *rzcA* con el gen *lacZ*: pMAGR21, pMAGR17 y pMAGR16. La fusión pMAGR16 abarca la región R, que guarda identidad con el elemento *hlyR*, mientras que las fusiones pMAGR17 y pMAGR21 la excluyen. Además, la fusión pMAGR21 excluye el promotor detectado mediante extensión de cebador en la región que flanquea en 5' al gen *rzcC*. Para construir el plásmido pMAGR21 se clonó un fragmento *KpnI-XbaI* de 1,9 kb del plásmido pMAGR19 (que contiene parte del gen *rzcC* y la región promotora del gen *rzcA*) en el plásmido pMP220 digerido con *KpnI-XbaI*. En el caso de pMAGR17 se clonó un fragmento *HindIII* de 2,7 kb del plásmido pMAGR12 (que contiene parte del ORF3, el gen *rzcC* y la región promotora de *rzcA*) en el sitio *HindIII* del plásmido pMP220. El plásmido pMAGR16 se construyó por clonación de un fragmento *EcoRI-BamHI* de 4,7 kb del plásmido pMAGR14 (que contiene parte del gen de la

transposasa, el gen de la integrasa, el ORF3, el gen *rzcC* y la región promotora del gen *rzcA*) en el plásmido pMP220 digerido con *EcoRI-BamHI* (ver mapas de la figuras 3.1 y 3.2).

4.7.1.3. Construcción de una fusión transcripcional ORF3-*lacZ* (pMAGR22)

El plásmido pMAGR22 se construyó por clonación de un fragmento *HindIII* de 0,86 kb del plásmido pMAGR14 (que contiene parte del gen de la integrasa y la región promotora de ORF3) en el sitio *HindIII* del plásmido pMP220 (ver mapas de la figuras 3.1 y 3.2).

4.7.1.4. Construcción de una fusión transcripcional *rzcD-lacZ* (pMAGR57)

Para construir el plásmido pMAGR57 se clonó un fragmento *KpnI-BamHI* de 1,8 kb del plásmido pMAGR40 (que contiene parte del gen *rzcA* y la región promotora del gen *rzcD*) en el plásmido pMP220 digerido con *KpnI-BamHI* (ver mapas de la figuras 3.1 y 3.2).

4.7.2. Actividad β -galactosidasa de las fusiones *rzcC-lacZ*, *rzcA-lacZ*, *ORF3-lacZ* y *rzcD-lacZ* en la cepa Z25 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

Para estudiar la actividad β -galactosidasa de las fusiones transcripcionales con el gen *lacZ* en la cepa Z25 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, estas se transfirieron a la cepa Z25 mediante conjugación triparental desde *E. coli* DH5 α con la ayuda del plásmido pRK2013 en *E. coli* DH5 α . Las transconjugantes se seleccionaron en placas de medio TY Sm Tc. Los niveles de actividad β -galactosidasa de las diferentes fusiones transcripcionales en la cepa Z25 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* se analizaron cada seis

horas mediante el ensayo de β -galactosidasa (anteriormente descrito en el apartado 3.4.1.1. del Material y Métodos), excepto en el caso de la fusión *rzcD-lacZ* (pMAGR57) para la que se hizo una única medida a las 24 horas. Como control se empleó la cepa Z25 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* con el plásmido pMP220.

Mientras que entre los niveles de actividad β -galactosidasa de la fusión *rzcC-lacZ* del plásmido pMAGR29 y los del plásmido pMP220 no existe diferencia significativa, la fusión *rzcC-lacZ* del plásmido pMAGR20 presentó una actividad β -galactosidasa de hasta 1151 unidades Miller a las 24 horas (27 veces superior a la actividad de la fusión de pMAGR29 a las 24 horas) (Figura 4.46).

En el caso de las fusiones del gen *rzcA*, la fusión del plásmido pMAGR16 presentó niveles de actividad β -galactosidasa similares a los del plásmido pMP220, al contrario que las fusiones de los plásmidos pMAGR21 y pMAGR17, cuya actividad β -galactosidasa a las 12 horas fue aproximadamente el doble y el triple de los niveles de pMP220 respectivamente (Figura 4.46).

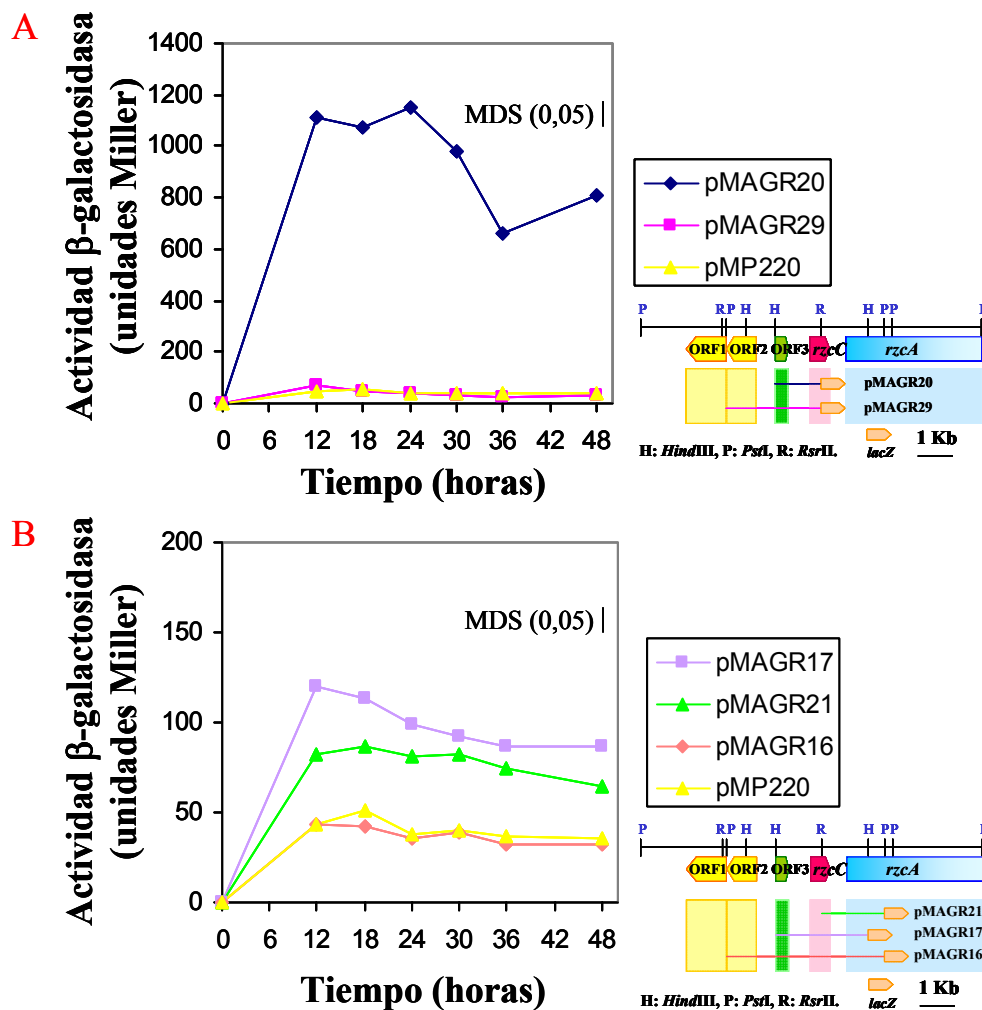


Figura 4.46: Actividad β -galactosidasa de las fusiones *rzcC-lacZ* de los plásmidos pMAGR20 y pMAGR29 (A) y de las fusiones *rzcA-lacZ* de los plásmidos pMAGR17, pMAGR21 y pMAGR16 (B) en células de la cepa Z25 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Los valores representan la media de al menos tres repeticiones. MDS (0,05): mínima diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%.

Los niveles de actividad β -galactosidasa de la fusión *ORF3-lacZ* fueron aproximadamente cuatro veces los niveles de pMP220 a las 24 horas, y la expresión de la fusión *rzcD-lacZ* fue tan sólo 5 unidades Miller mayor que la del plásmido pMP220 aunque la diferencia fue estadísticamente significativa (Figura 4.47).

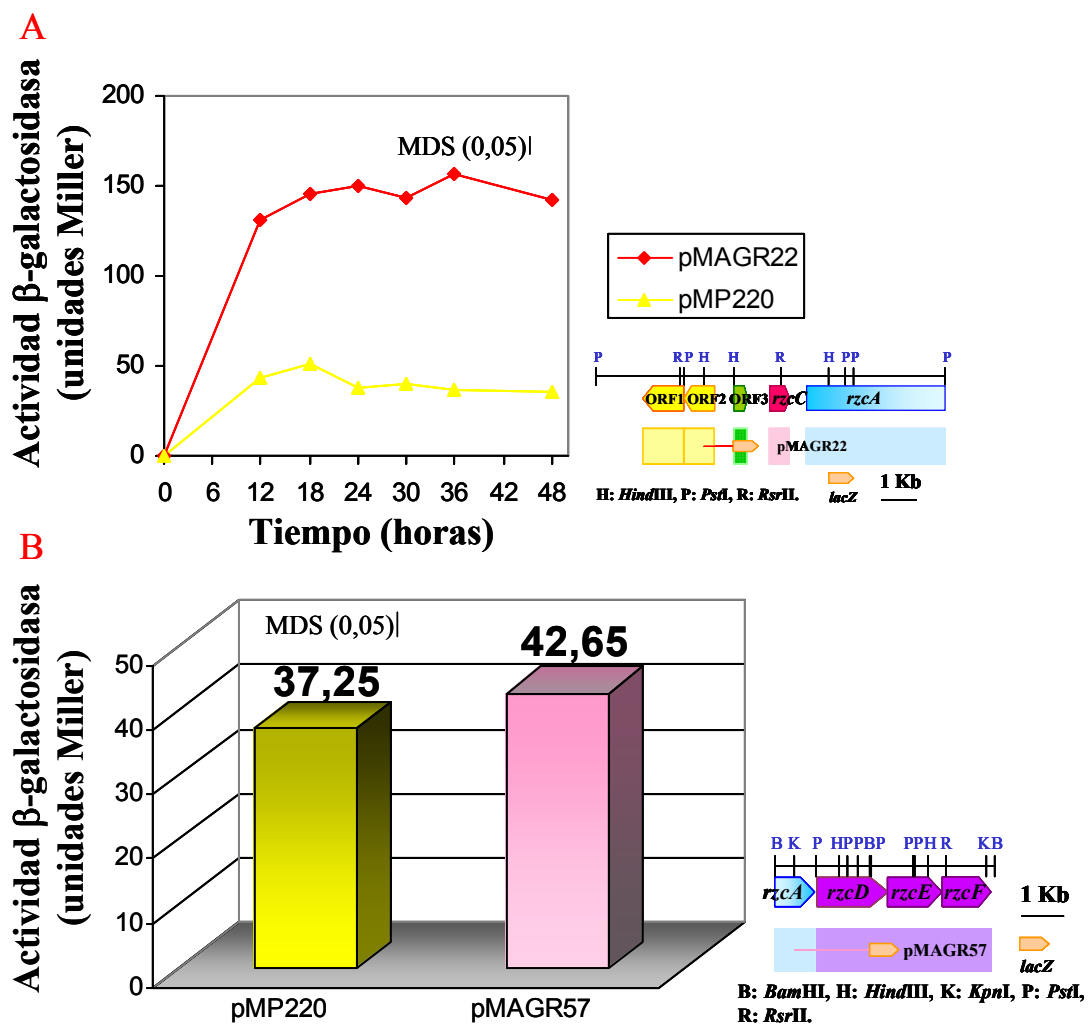


Figura 4.47: Actividad β -galactosidasa de la fusión ORF3-*lacZ* del plásmido pMAGR22 (A) y de la fusión *rzcD-lacZ* del plásmido pMAGR57 (B) en células de la cepa Z25 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Los valores representan la media de al menos tres repeticiones. MDS (0,05): mínima diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%.

4.7.3. Construcción de fusiones transcripcionales de los genes *rzcC* y *rzcA* con el gen *lacZ*

La diferencia existente en la expresión de actividad β -galactosidasa entre las fusiones *rzcC-lacZ* de los plásmidos pMAGR20 y pMAGR29, y entre las fusiones *rzcA-lacZ* de los plásmidos pMAGR16 y pMAGR17, dio lugar a la construcción de más fusiones transcripcionales para estudiar con más detalle la influencia de la región en 5' del gen *rzcC* en la expresión de los genes *rzcC* y *rzcA*.

4.7.3.1. Construcción de fusiones transcripcionales *rzcC-lacZ* (pMAGR37, pMAGR55, pMAGR50, pMAGR52, pMAGR54 y pMAGR59)

El plásmido pMAGR37 se construyó por clonación de un fragmento *KpnI-XbaI* de 1,9 kb del plásmido pMAGR36 en el plásmido pMP220 digerido con *KpnI-XbaI*. Este plásmido es igual que el plásmido pMAGR29 con la única diferencia de que tiene una delección *HindIII* que abarca parte de la integrasa y la región promotora de ORF3 (ver mapas de la figuras 3.1 y 3.2). Con la delección *HindIII* se suprime la región R de ADN que muestra identidad con el elemento *hlyR*.

En el caso de pMAGR55, se clonó un fragmento *EcoRI-XbaI* de 2,8 kb del plásmido pMAGR44 en el plásmido pMP220 digerido con *EcoRI-XbaI*. Este plásmido es igual que pMAGR37, excepto por el hecho de que el lugar de la delección está ocupado por un gen de resistencia a la gentamicina, en orientación contraria al gen *rzcC*, y de tamaño muy similar (ver mapas de la figuras 3.1 y 3.2).

El plásmido pMAGR59 se construyó por clonación de un fragmento amplificado por PCR de 2,67 kb digerido con *EcoRI-XbaI* en pMP220. Este plásmido es similar al plásmido pMAGR29, ya que el fragmento clonado en el plásmido pMAGR29 abarca la

secuencia que se encuentra entre las posiciones 3447 (sitio *Pst*I) y 6249 (sitio *Rsr*II) de la región de la bacteriocina y en el caso del pMAGR59 el fragmento clonado es el producto amplificado por PCR que va desde la posición 3431 hasta la posición 6095. La única diferencia entre ambos plásmidos es el fragmento adicional de 154 pares de bases, correspondiente a parte de la región codificante del gen *rzcC*, que forma parte de pMAGR29 (ver mapas de la figuras 3.1 y 3.2). Asimismo, se construyeron más fusiones *rzcC-lacZ* clonando fragmentos amplificados por PCR cuyos extremos 3' coincidían con el del fragmento clonado en pMAGR59, pero cuyos extremos 5' quedaban situados en una posición cada vez más cercana al ORF3. De esta manera, los plásmidos pMAGR50 y pMAGR52 se construyeron mediante la clonación en pMP220 de fragmentos amplificados por PCR y digeridos con *Kpn*I-*Xba*I de 1,5 kb y 1,88 kb respectivamente, y el plásmido pMAGR54 se construyó por clonación en pMP220 de un fragmento amplificado por PCR de 2,09 kb digerido con *Eco*RI-*Xba*I. La secuencia de los oligonucleótidos empleados en la amplificación por PCR se puede encontrar en la Tabla 4.30

4.7.3.2. Construcción de la fusión transcripcional *rzcA-lacZ* pMAGR43

El plásmido pMAGR43 se construyó por clonación de un fragmento *Kpn*I-*Xba*I de 3,8 kb, procedente del plásmido pMAGR42, en el plásmido pMP220 digerido con *Kpn*I-*Xba*I. Este plásmido es igual que el plásmido pMAGR16, con la única diferencia de que tiene una deleción *Hind*III que abarca parte de la integrasa y la región promotora de ORF3 y de este modo excluye la zona de ADN que muestra identidad con el elemento *hlyR*, de manera análoga al plásmido pMAGR37 (ver mapas de la figuras 3.1 y 3.2).

4.7.4. Actividad β -galactosidasa de las fusiones *rzcC-lacZ* (pMAGR37, pMAGR55, pMAGR50, pMAGR52, pMAGR54 y pMAGR59) y *rzcA-lacZ* (pMAGR43) en la cepa Z25 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

Para estudiar los niveles de actividad β -galactosidasa de las fusiones transcripcionales con el gen *lacZ* en la cepa Z25 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, estas se transfirieron a la cepa Z25 mediante conjugación triparental desde *E. coli* DH5 α , con la ayuda del plásmido pRK2013 en *E. coli* DH5 α . Las transconjugantes se seleccionaron en placas de medio TY Sm Tc. La actividad β -galactosidasa de las diferentes fusiones transcripcionales en la cepa Z25 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* se analizó cada seis horas mediante el ensayo de β -galactosidasa (anteriormente descrito en el apartado 3.4.1.1. del Material y Métodos), excepto en el caso de las fusiones *rzcC-lacZ* de pMAGR50, pMAGR52, pMAGR54 y pMAGR59, para las que se hizo una única medida a las 24 horas. Como control se empleó la cepa Z25 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* con el plásmido pMP220.

La fusión *rzcC-lacZ* del plásmido pMAGR37 presentó a las 30 horas una actividad β -galactosidasa 336,67 veces superior a la actividad de pMP220 y 169,78 veces mayor que la actividad de la fusión *rzcC-lacZ* del plásmido pMAGR20. Por otra parte, los niveles de actividad de la fusión *rzcC-lacZ* del plásmido pMAGR55 a las 18 horas fueron aproximadamente el triple de los niveles de pMP220 y seis veces menores que los niveles de la fusión *rzcC-lacZ* del plásmido pMAGR20 (Figura 4.18).

Los niveles de actividad β -galactosidasa de la fusión *rzcA-lacZ* del plásmido pMAGR43 fueron significativamente diferentes de los niveles de los plásmidos pMAGR16, pMAGR17 y pMAGR21. A las 12 horas, la actividad β -galactosidasa de la

fusión *rzcA-lacZ* del plásmido pMAGR43 fue 2,13 veces mayor que la actividad de pMP220, 2,17 veces mayor que la actividad de pMAGR16, 1,13 veces mayor que pMAGR21 y 1,28 veces menor que la actividad de pMAGR17 (Figura 4.49).

Por otra parte, no se encontró diferencia significativa entre los niveles de actividad β -galactosidasa de las fusiones *rzcC-lacZ* de los plásmidos pMAGR59, pMAGR54, pMAGR52 y pMAGR50 a las 24 horas. Sin embargo, la diferencia sí fue significativa al comparar los niveles de todas las fusiones anteriores con los niveles de actividad del plásmido pMP220. Se observó que la actividad β -galactosidasa de pMAGR59, pMAGR54, pMAGR52 y pMAGR50 fue aproximadamente 20 veces mayor que los niveles de actividad β -galactosidasa del plásmido pMP220 (Tabla 4.30).

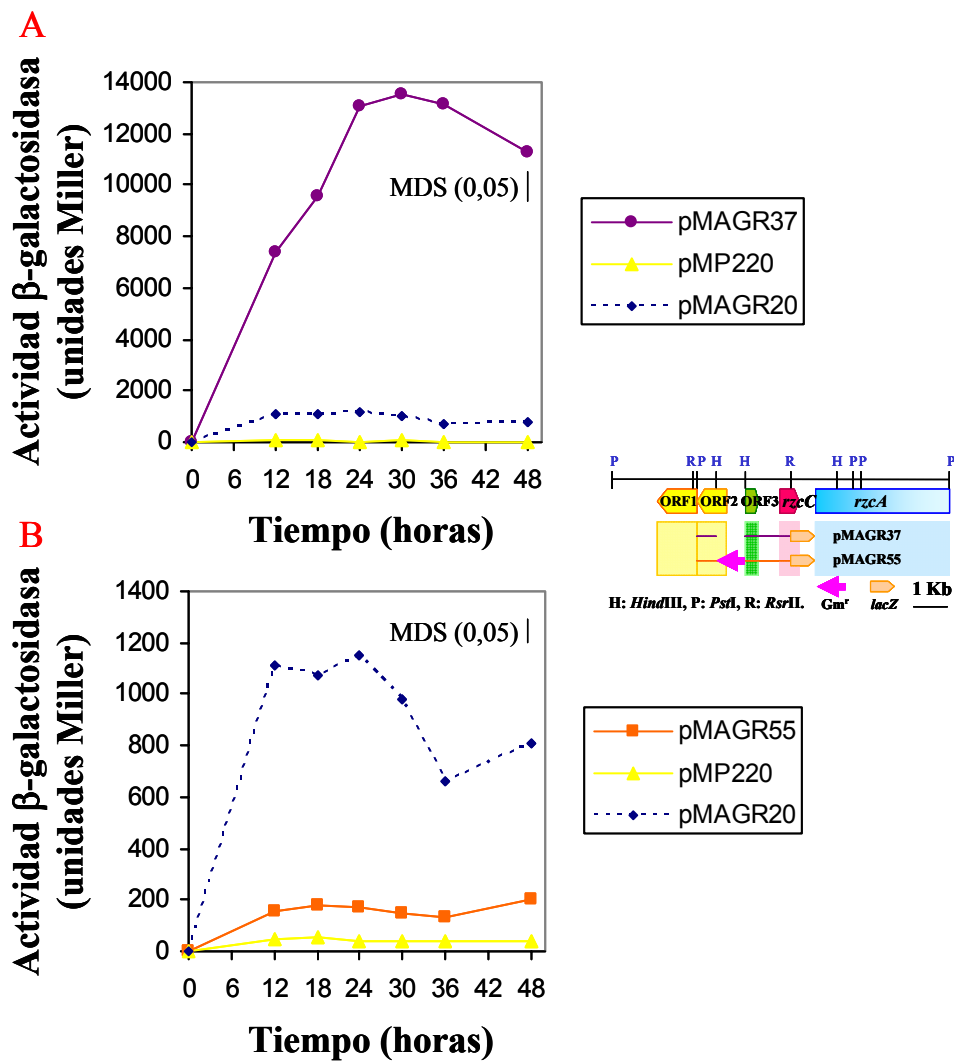


Figura 4.18: Actividad β -galactosidasa de las fusiones *rzC-lacZ* de los plásmidos pMAGR37 (A) y pMAGR55 (B) en células de la cepa Z25 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Los valores representan la media de al menos tres repeticiones. MDS (0,05): mínima diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%.

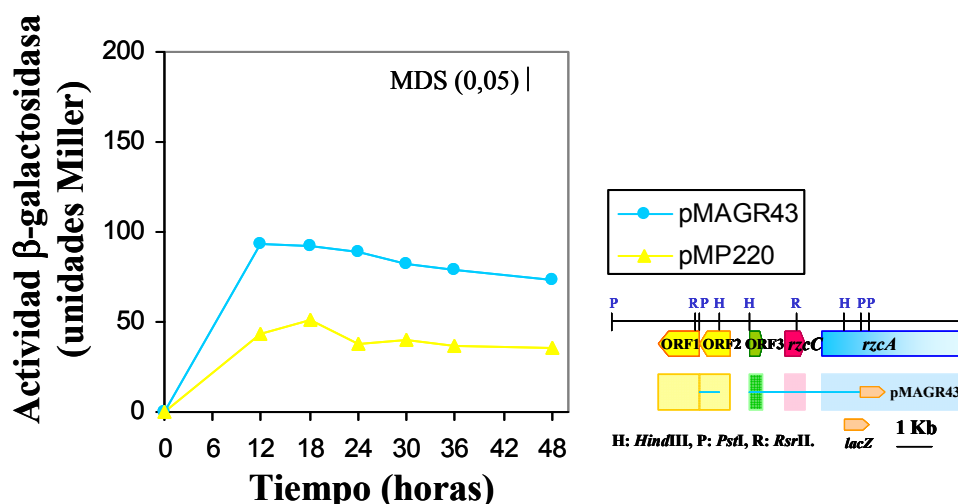
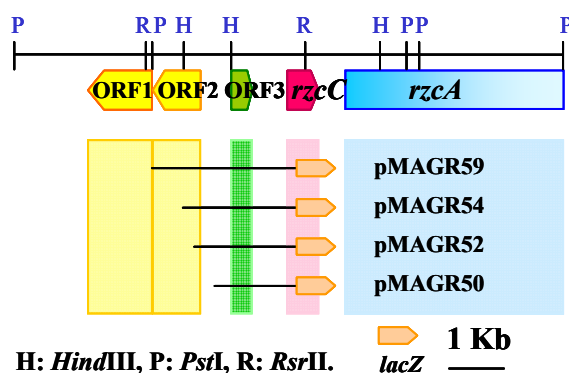


Figura 4.49: Actividad β -galactosidasa de la fusión *rzcA-lacZ* del plásmido pMAGR43 en células de la cepa Z25 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Los valores representan la media de al menos tres repeticiones. MDS (0,05): mínima diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 4.30: Actividad β -galactosidasa de las fusiones *rzcC-lacZ* de pMAGR59, pMAGR54, pMAGR52 y pMAGR50 en células de la cepa Z25 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* a las 24 horas. Los valores representan la media de al menos tres repeticiones. La mínima diferencia significativa con un nivel de confianza del 95% es de 128,134 unidades Miller. Se indican los oligonucleótidos empleados en la amplificación por PCR y las posiciones en la secuencia.

Plásmido	Oligonucleótidos	Posiciones	Actividad β -galactosidasa (unidades Miller)
pMAGR59	EcoRI4-XbaI	3431-6095	729,893
pMAGR54	EcoRI2-XbaI	4006-6095	751,72
pMAGR52	KpnI2-XbaI	4218-6095	845,26
pMAGR50	KpnI3-XbaI	4604-6095	811,133



Oligonucleótidos empleados:

EcoRI4: ccgaattcAATGTCCGCCACCTGCAG
 EcoRI2: gtggaattcATCTCGTCGCCGTTTAGG
 KpnI2: ccggtaccGAAATAGCGGAGAACT
 KpnI3: cacggtaccGGCGAGTTTCTTCTGG
 XbaI: ggtctagaTGGTGGAGGTCG

4.7.5. Actividad β -galactosidasa de las fusiones *rzcC-lacZ*, *rzcA-lacZ*, *ORF3-lacZ* y *rzcD-lacZ* en la cepa *Z25-cinI* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

Para estudiar los niveles de actividad β -galactosidasa de las fusiones transcripcionales con el gen *lacZ* en la cepa *Z25-cinI* de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, estas se transfirieron a la cepa *Z25-cinI* mediante conjugación triparental desde *E. coli* DH5 α , con la ayuda del plásmido pRK2013 en *E. coli* DH5 α . Las transconjugantes se seleccionaron en placas de medio TY Sm Tc. La actividad β -galactosidasa de las diferentes fusiones transcripcionales en la cepa *Z25-cinI* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* se analizó cada seis horas mediante el ensayo de β -galactosidasa (anteriormente descrito en el apartado 3.4.1.1. del Material y Métodos). Como control se empleó la cepa *Z25-cinI* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* con el plásmido pMP220.

No se encontró diferencia significativa entre los niveles de actividad β -galactosidasa de la fusión *rzcC-lacZ* del plásmido pMAGR29 y los niveles del plásmido pMP220. La actividad β -galactosidasa de la fusión *rzcC-lacZ* del plásmido pMAGR20 a partir de las 18 horas fue aproximadamente 20 veces mayor que la actividad de β -galactosidasa del plásmido pMP220. A las 18 horas los niveles de actividad β -galactosidasa de las fusiones *rzcC-lacZ* de los plásmidos pMAGR37 y pMAGR55 fueron aproximadamente 18 y 5 veces mayores que los niveles de actividad β -galactosidasa del plásmido pMP220 (Figura 4.50).

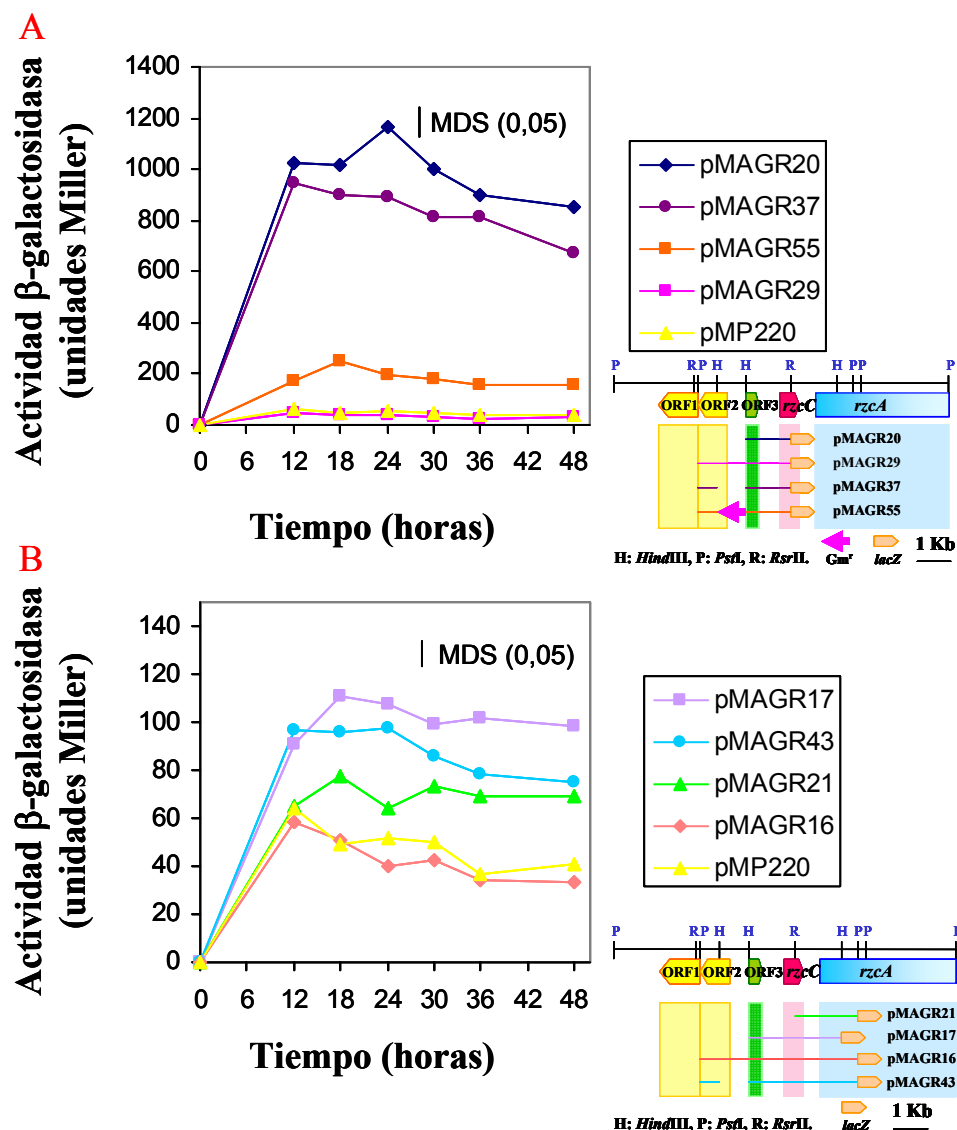


Figura 4.50: Actividad β -galactosidasa de las fusiones *rzcC-lacZ* de los plásmidos pMAGR20, pMAGR37, pMAGR55 y pMAGR29 (A) y de las fusiones *rzcA-lacZ* de los plásmidos pMAGR17, pMAGR43, pMAGR21 y pMAGR16 (B) en células de la cepa Z25-*cinI* de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Los valores representan la media de al menos tres repeticiones. MDS (0,05): mínima diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%.

Los niveles de actividad β -galactosidasa de las fusiones *rzcA-lacZ* de los plásmidos pMAGR17, pMAGR43 y pMAGR21 a las 18 horas fueron 2,27, 1,96 y 1,57

veces mayores respectivamente que los niveles de actividad β -galactosidasa de pMP220. Los niveles de actividad β -galactosidasa de la fusión *rzcA-lacZ* del plásmido pMAGR16 fueron menores que los niveles de actividad β -galactosidasa de pMP220 en todos los puntos excepto a las 18 horas, por lo que a pesar de que la diferencia fue significativa se puede considerar que no existe tal diferencia entre la actividad β -galactosidasa de pMAGR16 y pMP220 (Figura 4.50).

A las 18 horas los niveles de actividad β -galactosidasa de la fusión *ORF3-lacZ* fueron 2,68 veces mayores que los niveles del plásmido pMP220 (Figura 4.51).

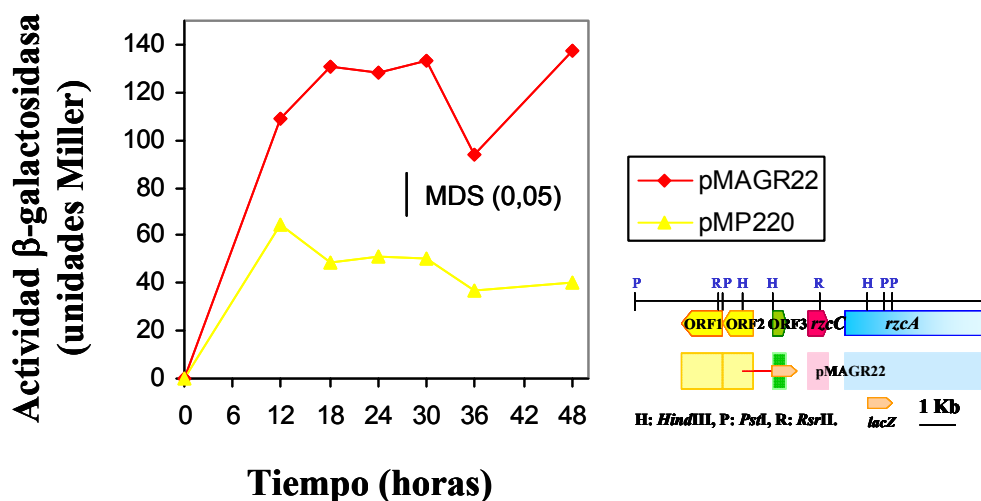


Figura 4.51: Actividad β -galactosidasa de la fusión *ORF3-lacZ* del plásmido pMAGR22 en células de la cepa Z25-*cinI* de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Los valores representan la media de al menos tres repeticiones. MDS (0,05): mínima diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%.

4.7.6. Actividad β -galactosidasa de las fusiones *rzcC-lacZ*, *rzcA-lacZ*, *ORF3-lacZ* y *rzcD-lacZ* en la cepa DH5 α de *Escherichia coli*

Durante la construcción de las fusiones transcripcionales se observó que tras seleccionar los clones en placas de medio LB Tc X-Gal el clon correcto era azul o blanco según si

la fusión se expresaba en la cepa Z25 o no. Se llegó a la conclusión de que las fusiones se estaban expresando en la cepa DH5 α de *Escherichia coli*, y esta circunstancia se aprovechó para medir los niveles actividad β -galactosidasa de las fusiones transcripcionales en un fondo genético distinto de *Rhizobium leguminosarum*. La actividad β -galactosidasa de las diferentes fusiones en la cepa DH5 α de *Escherichia coli* se midió mediante el ensayo de β -galactosidasa (anteriormente descrito en el apartado 3.4.1.2 del Material y Métodos) a intervalos de seis horas. Como control se empleó la cepa DH5 α de *Escherichia coli* con el plásmido pMP220.

Los niveles de actividad β -galactosidasa de la fusión *rzcC-lacZ* del plásmido pMAGR37 fueron 135 veces mayores que los niveles de actividad β -galactosidasa del plásmido pMP220 a las 12 horas y 84 veces mayores a las 18 horas. Las fusiones *rzcC-lacZ* de los plásmidos pMAGR20 y pMAGR55 presentaron unos niveles de actividad β -galactosidasa a las 18 horas que fueron aproximadamente 51 y 24 veces mayores respectivamente que los niveles de actividad β -galactosidasa del plásmido pMP220. No se observó diferencia significativa entre la actividad β -galactosidasa de la fusión *rzcC-lacZ* del plásmido pMAGR29 y la actividad β -galactosidasa del plásmido pMP220 (Figura 4.).

Los niveles de actividad β -galactosidasa de la fusión *rzcC-lacZ* del plásmido pMAGR16 a las 12 horas fueron unas 10 veces mayores que los niveles de actividad del plásmido pMP220, aunque posteriormente los niveles disminuyeron hasta ser similares a los de pMP220. A las 18 horas los niveles de actividad β -galactosidasa de la fusión *rzcA-lacZ* del plásmido pMAGR17 fueron aproximadamente 25 veces mayores que los niveles de actividad β -galactosidasa del plásmido pMP220, mientras que los niveles de las fusiones *rzcA-lacZ* de los plásmidos pMAGR43 y pMAGR21 fueron

aproximadamente 15 y 13 veces mayores que los del plásmido pMP220 respectivamente (Figura 4.52).

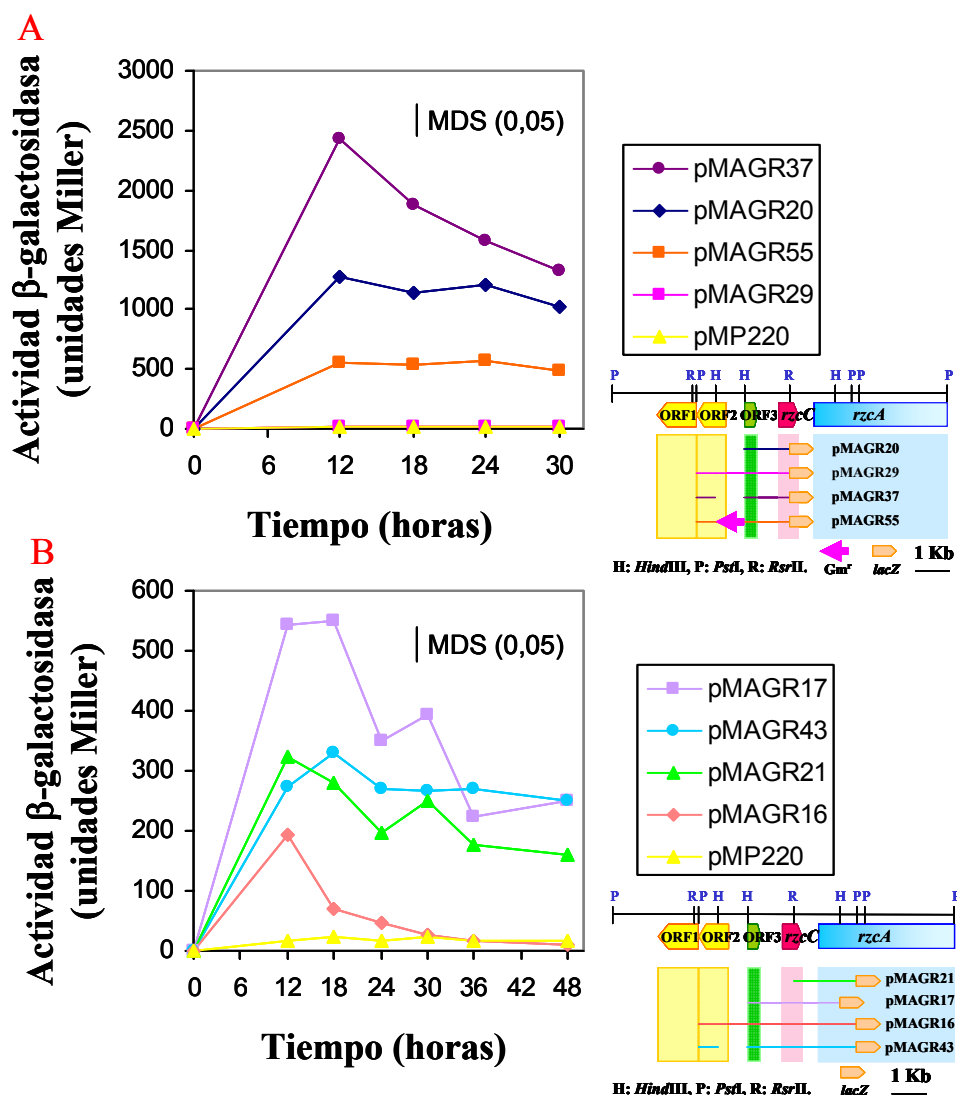


Figura 4.52: Actividad β -galactosidasa de las fusiones *rzcC-lacZ* de los plásmidos pMAGR20, pMAGR37, pMAGR55 y pMAGR29 (A) y de las fusiones *rzcA-lacZ* de los plásmidos pMAGR17, pMAGR43, pMAGR21 y pMAGR16 (B) en células de la cepa DH5 α de *Escherichia coli*. Los valores representan la media de al menos tres repeticiones. MDS (0,05): mínima diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%.

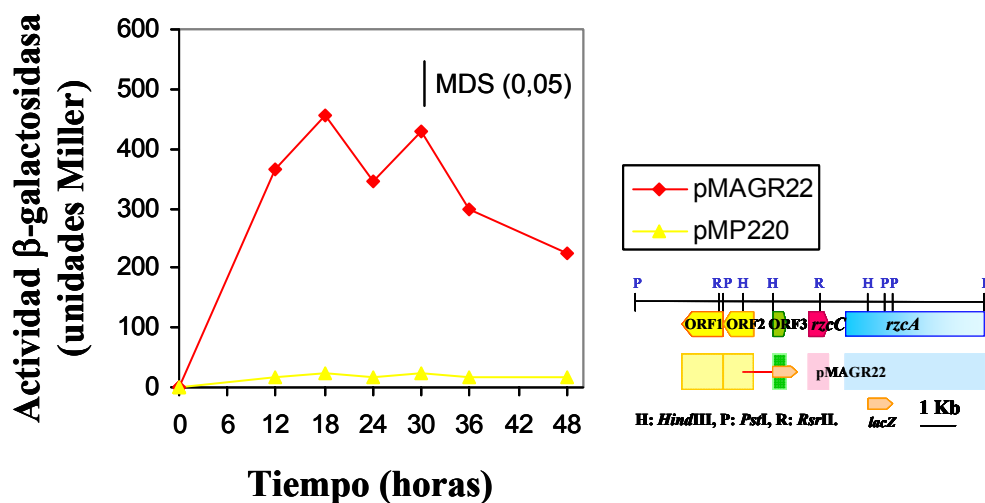


Figura 4.53: Actividad β-galactosidasa de la fusión ORF3-*lacZ* del plásmido pMAGR22 en células de la cepa DH5α de *Escherichia coli*. Los valores representan la media de al menos tres repeticiones. MDS (0,05): mínima diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%.

A las 18 horas la actividad β-galactosidasa de la fusión ORF3-*lacZ* del plásmido pMAGR22 fue aproximadamente 20 veces mayor que la actividad del plásmido pMP220 (Figura 4.53).

4.8. CONSTRUCCIÓN DE LAS MUTANTES *Z25-rzcC*, *Z25-ORF3*, *Z25-ΔpORF3* Y *Z25-ΔpORF3::Gm*

4.8.1. Construcción de las cepas mutantes *Z25-rzcC* y *Z25-ORF3*

4.8.1.1. Construcción de la cepa mutante *Z25-rzcC*

Para construir la mutante *Z25-rzcC* se partió del plásmido pMAGR12, que contiene parte del ORF3, el gen *rzcC* y parte del gen *rzcA*, y se llevó a cabo un análisis de los sitios de restricción en el gen *rzcC* que fueran únicos en toda la secuencia del plásmido pMAGR12. Se eligió un sitio *RsrII* para construir una mutante en el gen *rzcC* por inserción de un gen de resistencia a la gentamicina. Para esto, se llevó a cabo una digestión del plásmido pMAGR12 con la enzima *RsrII*, se convirtieron los extremos cohesivos en romos gracias a la enzima de Klenow y se ligó con un fragmento *SmaI* de 0,86 kb que contenía el gen de resistencia a la gentamicina (ver apartado 4.5.4.). La ligación se transformó en células competentes de *Escherichia coli* DH5α, y posteriormente se seleccionó en una placa de medio LB Ap Gm. A los clones resultantes se les extrajo el ADN plasmídico por lisis alcalina y se comprobaron por digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa. El clon correcto se denominó pMAGR26.

El plásmido pMAGR26 se digirió con la enzima *HindIII*, y se ligó con el plásmido pK18*mobsacB* digerido con la misma enzima de restricción. La ligación se transformó en células competentes de *Escherichia coli* DH5α, y posteriormente se seleccionó en una placa de medio LB Km Gm. A los clones resultantes se les extrajo el ADN plasmídico por lisis alcalina y se comprobaron por digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa. El clon correcto recibió el nombre de

pMAGR28. Con la ayuda de este plásmido se realizó una recombinación doble en la cepa Z25 (ver Material y Métodos, apartado 3.2.14.) y se obtuvo la cepa mutante Z25-*rzcC*.

4.8.1.2. Construcción de la cepa mutante Z25-ORF3⁻

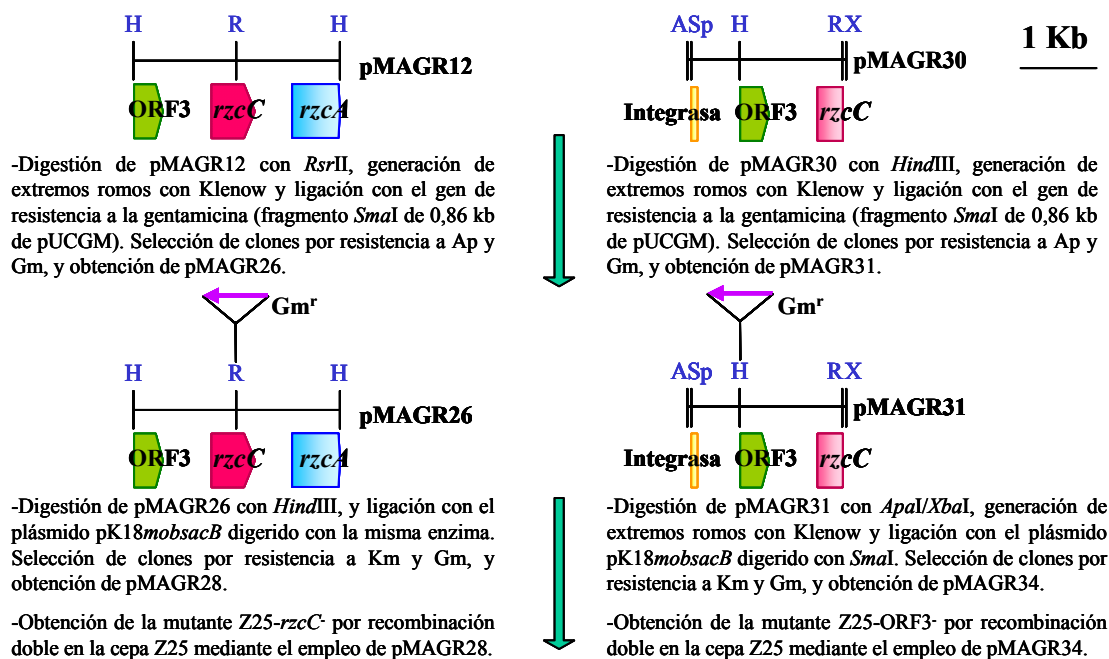
Para la construcción de la mutante Z25-ORF3⁻ se partió del plásmido pMAGR30, que contiene parte del gen de la integrasa, el gen ORF3 y parte del gen *rzcC*, y se llevó a cabo un análisis de los sitios de restricción en el ORF3 que fueran únicos en toda la secuencia del plásmido pMAGR30. Se eligió un sitio *Hind*III para construir una mutante en la posible región promotora del gen ORF3 por inserción de un gen de resistencia a la gentamicina (ver apartado 4.5.4.). Para esto, se llevó a cabo una digestión del plásmido pMAGR30 con la enzima *Hind*III, se convirtieron los extremos cohesivos en romos gracias a la enzima de Klenow y se ligó con un fragmento *Sma*I de 0,86 kb que contenía el gen de resistencia a la gentamicina. La ligación se transformó en células competentes de *Escherichia coli* DH5 α , y posteriormente se seleccionó en una placa de medio LB Ap Gm. A los clones resultantes se les extrajo el ADN plasmídico por lisis alcalina y se comprobaron por digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa. El clon correcto se denominó pMAGR31.

El plásmido pMAGR31 se digirió con las enzimas *Apa*I/*Xba*I, los extremos cohesivos se hicieron romos gracias a la enzima de Klenow y se ligó con el plásmido pK18*mobsacB*, digerido con la enzima *Sma*I. La ligación se transformó en células competentes de *Escherichia coli* DH5 α , y posteriormente se seleccionó en una placa de medio LB Km Gm. A los clones resultantes se les extrajo el ADN plasmídico por lisis alcalina y se comprobaron por digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa. El clon correcto recibió el nombre de pMAGR34. Con la ayuda de este

plásmido se realizó una recombinación doble en la cepa Z25 (ver Material y Métodos, apartado 3.2.14.) y se obtuvo la cepa mutante Z25-ORF3⁻.

4.8.1.3. Comprobación de las mutantes Z25-*rzcC*⁻ y Z25-ORF3⁻

Las mutantes Z25-*rzcC*⁻ y Z25-ORF3⁻ se comprobaron con la ayuda de una hibridación por *Southern blot*. Para ello se preparó ADN genómico de las mutantes Z25-*rzcC*⁻ y Z25-ORF3⁻, se llevaron a cabo digestiones del ADN genómico de ambas cepas con las enzimas *EcoRV* y *HindIII*, y se realizó una electroforesis de los fragmentos de restricción. A continuación se hizo una hibridación utilizando como sonda el fragmento *SmaI* de 0,86 kb de pUCGM, que contiene el gen de resistencia a la gentamicina. Como controles negativos se incluyeron digestiones de ADN genómico de la cepa Z25 con las enzimas *HindIII*, *SacI/BamHI* y *EcoRI*, y como control positivo el fragmento *SmaI* de 0,86 kb de pUCGM que contiene el gen de resistencia a la gentamicina. En el caso del ADN genómico de la mutante Z25-*rzcC*⁻ digerido con *EcoRV* se obtuvo una señal de 3,07 kb solapada con otra señal de 2,96 kb, y en el caso de la digestión con *HindIII* se obtuvo una señal de 3,59 kb. Para la mutante Z25-ORF3⁻ en el caso de la digestión con *EcoRV* se obtuvieron dos señales de 4,43 y 1,60 kb, y en el caso de la digestión con *HindIII* se obtuvo una señal de 4,45 kb (Figura 4.54). Los tamaños de las señales obtenidas estuvieron acordes con la secuencia de la región mutada.



Comprobación de las mutantes mediante hibridación empleando como sonda el fragmento *SmaI* de 0,86 kb de pUCGM (gen de resistencia a la gentamicina)

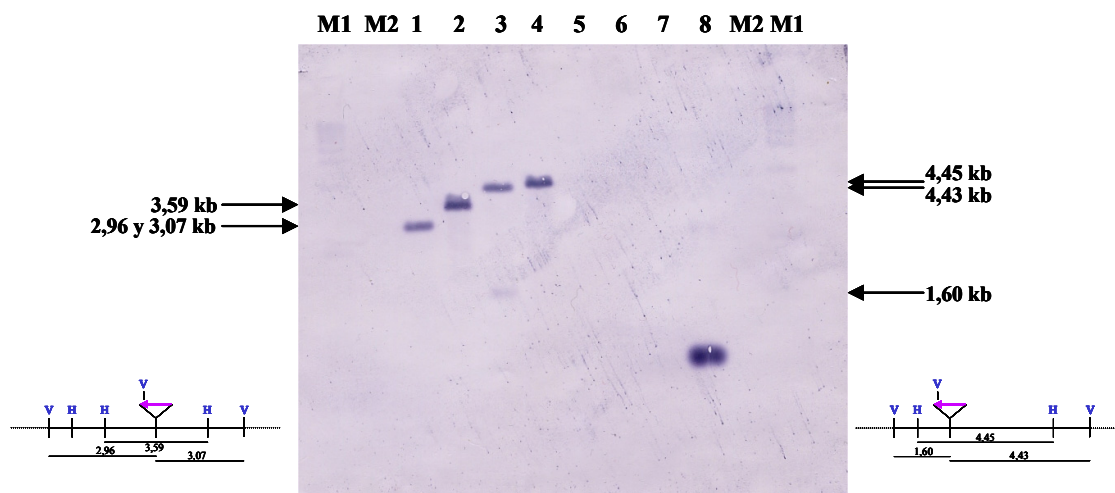


Figura 4.54: Estrategia para la construcción de dos cepas mutantes en los genes *rzcC* y ORF3. M1: marcador lambda *HindIII*; M2: marcador escalera de 1 kb; 1 y 2: ADN genómico de Z25-*rzcC* digerido con *EcoRV* y *HindIII* respectivamente; 3 y 4: ADN genómico de Z25-ORF3 digerido con *EcoRV* y *HindIII* respectivamente; 5, 6 y 7: ADN genómico de Z25 digerido con *HindIII*, *SacI/BamHI* y *EcoRV* respectivamente; 8: fragmento *SmaI* de 0,86 kb de pUCGM que contiene el gen de resistencia a la gentamicina. Las flechas negras indican el tamaño de las señales de hibridación. A: *ApaI*, H: *HindIII*, R: *RsrII*, Sp: *SphI*, V: *EcoRV*, X: *XbaI*.

4.8.2. Construcción de las mutantes Z25- Δ pORF3::Gm y Z25- Δ pORF3

4.8.2.1. Construcción de la mutante Z25- Δ pORF3::Gm

Para construir la mutante Z25- Δ pORF3::Gm se partió del plásmido pMAGR35, que contiene parte del gen de la transposasa, el gen de la integrasa, el ORF3 y parte del gen *rzcC*. Para eliminar la región que se encuentra en 5' con respecto al ORF3, se llevó a cabo una deleción *HindIII* de manera que quedaron fusionados el gen de la integrasa y el ORF3. Para ello se digirió el plásmido pMAGR35 con la enzima *HindIII* y se religó. La ligación se transformó en células competentes de *Escherichia coli* DH5 α , y posteriormente se seleccionó en una placa de medio LB Ap. A los clones resultantes se les extrajo el ADN plasmídico por lisis alcalina y se comprobaron por digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa. El clon correcto se denominó pMAGR36 y se aprovechó el sitio *HindIII*, que era único en toda la secuencia del plásmido pMAGR36, para insertar el gen de resistencia a la gentamicina (ver apartado 4.5.4.). Para esto, se llevó a cabo una digestión del plásmido pMAGR36 con la enzima *HindIII*, se convirtieron los extremos cohesivos en romos gracias a la enzima de Klenow y se ligó con un fragmento *SmaI* de 0,86 kb de pUCGM que contenía el gen de resistencia a la gentamicina. La ligación se transformó en células competentes de *Escherichia coli* DH5 α , y posteriormente se seleccionó en una placa de medio LB Ap Gm. A los clones resultantes se les extrajo el ADN plasmídico por lisis alcalina y se comprobaron por digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa. El clon correcto se denominó pMAGR44.

El plásmido pMAGR44 se digirió con las enzimas *EcoRI/XbaI*, y el fragmento de 2,8 kb se ligó con el plásmido pK18*mobsacB* digerido con las mismas enzimas de restricción. La ligación se transformó en células competentes de *Escherichia coli*

DH5 α , y posteriormente se seleccionó en una placa de medio LB Km Gm. A los clones resultantes se les extrajo el ADN plasmídico por lisis alcalina y se comprobaron por digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa. El clon correcto recibió el nombre de pMAGR48. Con la ayuda de este plásmido se realizó una recombinación doble en la cepa Z25 (ver Material y Métodos, apartado 3.2.14.) y se obtuvo la cepa mutante Z25- Δ pORF3::Gm.

4.8.2.2. Comprobación de las mutantes Z25- Δ pORF3::Gm

Para comprobar la mutante Z25- Δ pORF3::Gm se realizaron dos amplificaciones por PCR con dos grupos de oligonucleótidos (L2-P22 y L2-PGm), y como ADN molde se empleó ADN genómico de la cepa mutante. Como control se realizaron las mismas amplificaciones por PCR con ADN genómico de la cepa Z25 (Figura 4.55). La secuencia de los cebadores, los parámetros de la reacción de PCR y los componentes de dicha reacción se muestran a continuación.

Cebadores:

L2: AATGCGATGGGTATAGC
P22: GAGAGTTTCGCAAGAACC
PGm: ACGATGTTACGCAGCAGG

Programa:

- 95°C 2'
- 30x 95°C 1'
 50°C 1'
 72°C 5'
- 72°C 10'

Componentes (μ L):

- ADN cepa Z25- Δ pORF3::Gm..... 1
- Tampón..... 2,5
- Oligonucleótido L2..... 1
- Oligonucleótido P22 o PGm..... 1
- dNTPs 1
- Pfu Turbo ADN polimerasa..... 0,5
- Agua bidestilada 18

4.8.2.3. Construcción de la mutante Z25- Δ pORF3

Para la construcción de la mutante Z25- Δ pORF3 se tuvo que recurrir a otra estrategia. Al no existir un marcador de resistencia a antibiótico, la recombinación doble en la cepa Z25 resultaba dificultosa, por lo que se pensó en realizar la recombinación doble en la cepa mutante Z25- Δ pORF3::Gm. Para ello se partió del plásmido pMAGR36, ya descrito en el apartado anterior. El plásmido pMAGR36 se digirió con las enzimas *EcoRI/XbaI*, y se ligó con el plásmido pK18*mobsacB* digerido con las mismas enzimas de restricción. La ligación se transformó en células competentes de *Escherichia coli* DH5 α , y posteriormente se seleccionó en una placa de medio LB Km. A los clones resultantes se les extrajo el ADN plasmídico por lisis alcalina y se comprobaron por digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa. El clon correcto recibió el nombre de pMAGR38. Con la ayuda de este plásmido se realizó una recombinación doble en la cepa Z25- Δ pORF3::Gm (ver Material y Métodos, apartado 3.2.14.) y se obtuvo la cepa mutante Z25- Δ pORF3.

4.8.2.4. Comprobación de la mutante Z25- Δ pORF3

Para comprobar la mutante Z25- Δ pORF3 se realizaron dos amplificaciones por PCR con dos grupos de oligonucleótidos (L2-P22 y L2-PGm), y como ADN molde se empleó el producto de la lisis de una colonia de la cepa mutante. Como control se realizaron las mismas amplificaciones por PCR, empleando como ADN molde ADN genómico de la cepa Z25 (Figura 4.55). La secuencia de los cebadores, los parámetros de la reacción de PCR y los componentes de dicha reacción se muestran a continuación.

Cebadores:

L2: AATGCGATGGGTATAGC
P22: GAGAGTTTCGCAAGAACC
PGm: ACGATGTTACGCAGCAGG

Programa:

- 95°C 2'
- 30x 95°C 1'
 50°C 1'
 72°C 5'
- 72°C 10'

Componentes (µL):

- Producto de lisis 4
- Tampón 2,5
- Oligonucleótido L2 1
- Oligonucleótido P22 o PGm 1
- dNTPs 1
- Taq ADN polimerasa BIOLINE... 0,3
- MgCl₂ 0,75
- DMSO 1,25
- Agua bidestilada 13,2

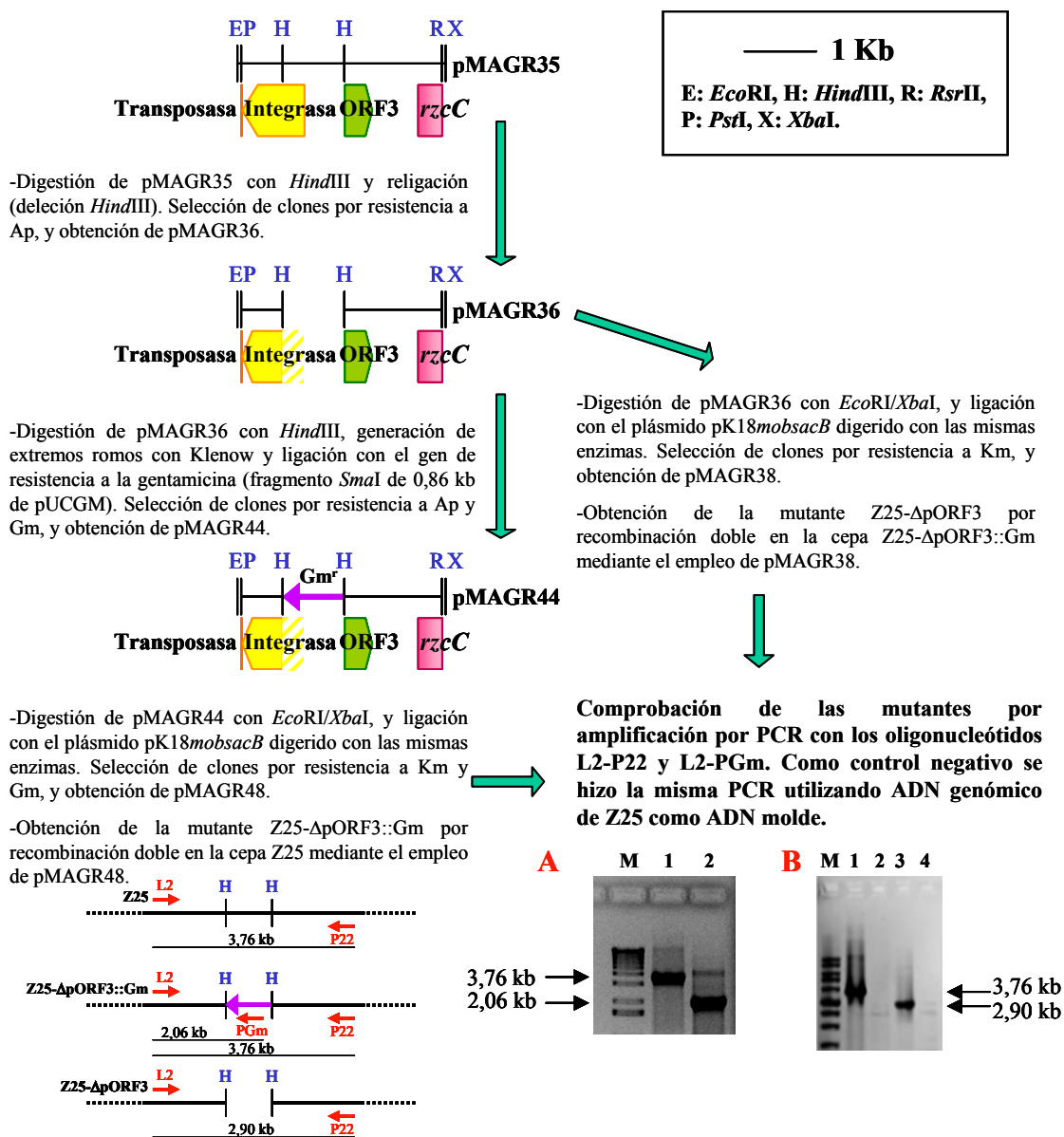


Figura 4.55: Estrategia para la construcción de las mutantes Z25-ΔpORF3::Gm y Z25-ΔpORF3. Los oligonucleótidos se indican con flechas rojas. M: marcador escalera de 1 kb. A) 1 y 2: producto de la PCR empleando como ADN molde ADN genómico de Z25-ΔpORF3::Gm con los oligonucleótidos L2-P22 y L2-PGm respectivamente. B) 1 y 2: producto de la PCR empleando como ADN molde ADN genómico de Z25 con los oligonucleótidos L2-P22 y L2-PGm respectivamente; 3 y 4: producto de la PCR empleando como ADN molde ADN genómico de Z25-ΔpORF3 con los oligonucleótidos L2-P22 y L2-PGm respectivamente. Las flechas indican el tamaño de los productos de PCR.

4.9. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINA EN MEDIO SÓLIDO

Se estudió la producción de bacteriocinas en medio sólido por las cepas Z25, 4420, *Z25-rzcC*, *Z25-ORF3*, *Z25-ΔpORF3::Gm*, *Z25-ΔpORF3* y *Z25-cinI* mediante la técnica de antagonismo diferido (apartado 3.2.11.). No se observó producción de bacteriocina en las cepas 4420 y *Z25-rzcC*. En el caso de la cepa *Z25-cinI* el halo de inhibición fue siempre algo menor que el halo de inhibición de la cepa Z25 y en el resto de las cepas el tamaño del halo de inhibición fue similar al tamaño del halo de inhibición de la cepa Z25 (Figura 4.56).

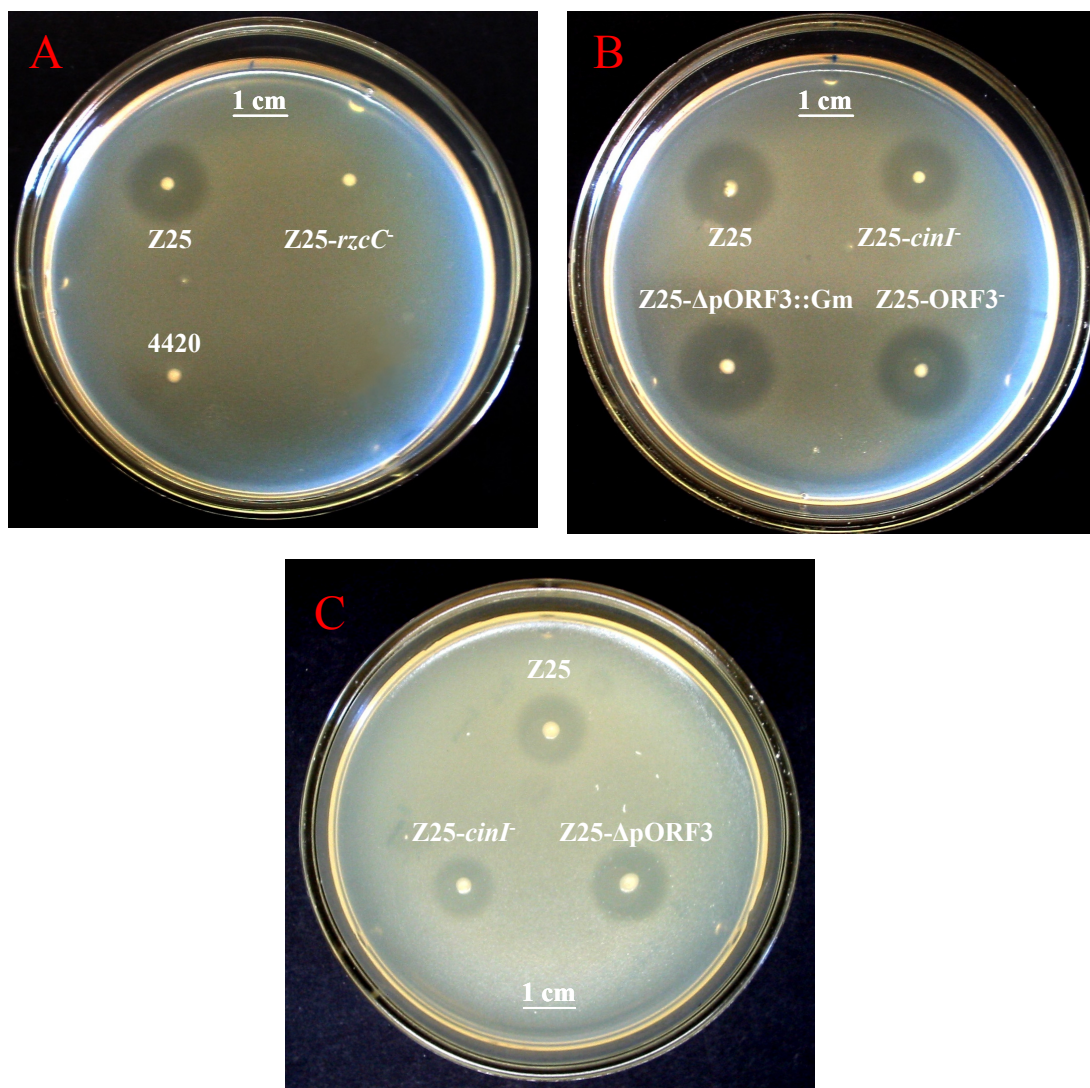


Figura 4.56: Producción de bacteriocinas en medio sólido por las cepas Z25, 4420, Z25-*rzcC*⁻, Z25-ORF3⁻, Z25- Δ pORF3::Gm, Z25- Δ pORF3 y Z25-*cinI*⁻.

4.10. ENSAYO DE COMPETICIÓN EN MEDIO LÍQUIDO ENTRE LAS CEPAS Z25, 4420, Z25- Δ pORF3 Y Z25-*cinI* Y LA CEPA SENSIBLE A LA BACTERIOCINA M17

Se realizaron ensayos de competición en medio líquido entre la cepa Z25 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* y sus derivadas (4420, Z25- Δ pORF3 y Z25-*cinI*) y la cepa M17 Sp^r de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, sensible a la bacteriocina, tal y como se describe en el apartado 3.1.6.

En el caso del ensayo de competición en medio líquido, entre las cepas Z25 y M17 Sp^r se observó una diferencia de una unidad logarítmica (concretamente 1,09) en el número de UFC/mL a partir de las 24 horas, mientras que en el ensayo de competición entre las cepas 4420 y M17 Sp^r no hubo una diferencia estadísticamente significativa. En el ensayo de competición entre las cepas Z25-*cinI* y M17 Sp^r se vio que a las 24 horas la diferencia en el número de UFC/mL era de una unidad logarítmica, a las 36 horas esta diferencia pasó a ser de 1,27 unidades logarítmicas y a las 48 horas de 1,19 unidades logarítmicas. En el ensayo entre las cepas Z25- Δ pORF3 y M17 Sp^r la diferencia en el número de UFC/mL fue mayor de una unidad logarítmica a partir de las 24 horas, llegando a ser 1,63 a las 36 horas y 1,15 a las 48 horas (Figura 4.57). Hay que destacar que en ninguno de los casos se observó diferencia entre el número de UFC/mL de las cepas que competían entre sí a las 12 horas.

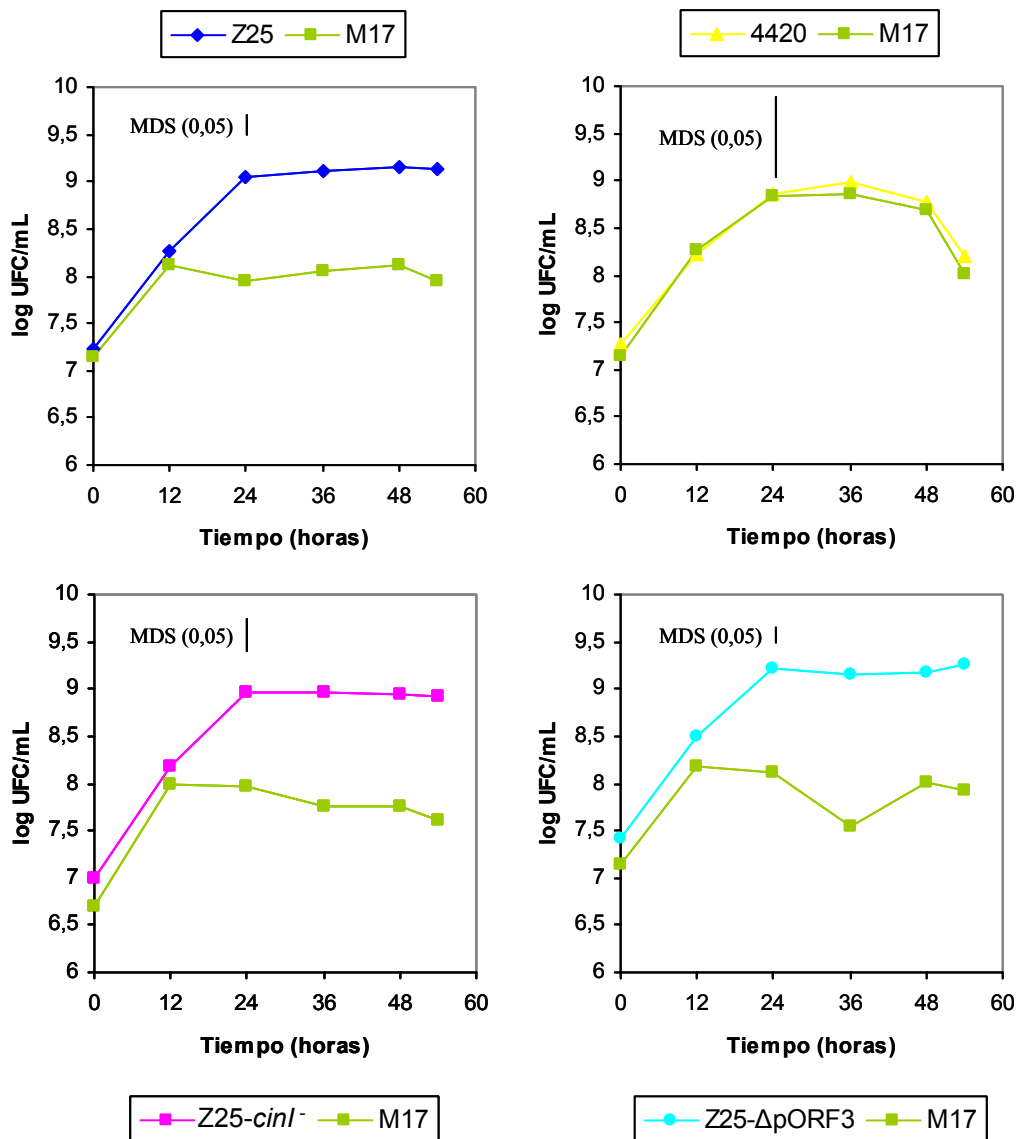


Figura 4.57: Ensayo de competición en medio líquido entre las cepas Z25 y sus derivadas (4420, Z25- Δ pORF3 y Z25-*cinI*) y la cepa M17 Sp^r. Los valores representan la media de tres repeticiones. MDS (0,05): mínima diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%.

4.11. ENSAYOS CON PLANTAS

4.11.1. Ensayos de nodulación

En primer lugar se inocularon plantas de guisante (*Pisum sativum* cv. Frisson) con las cepas Z25, 4420, Z25-*cinI* y Z25- Δ pORF3 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, tal y como se describe en el apartado 3.3.1, y el ensayo de nodulación se llevó a cabo según el apartado 3.3.2.

No se observaron diferencias significativas en el número de nódulos por planta formado por cada cepa. A los cinco días de la inoculación, las plantas inoculadas con las distintas cepas presentaron un número de nódulos cuyas medias tuvieron valores comprendidos entre los 4 y los 6,25 nódulos/planta. A los 14 y 16 días las plantas inoculadas con la cepa 4420 tuvieron un número de nódulos por planta cuya media fue algo mayor que para el resto de las plantas, aunque no fue significativamente diferente. A los 19 días las plantas inoculadas con las cepas Z25, 4420 y Z25-*cinI* tuvieron un número de nódulos cuya media superaba los 225 nódulos/planta, mientras que en el caso de las plantas inoculadas con la cepa Z25- Δ pORF3 la media del número de nódulos era de 192,75 nódulos/planta (Figura 4.58).

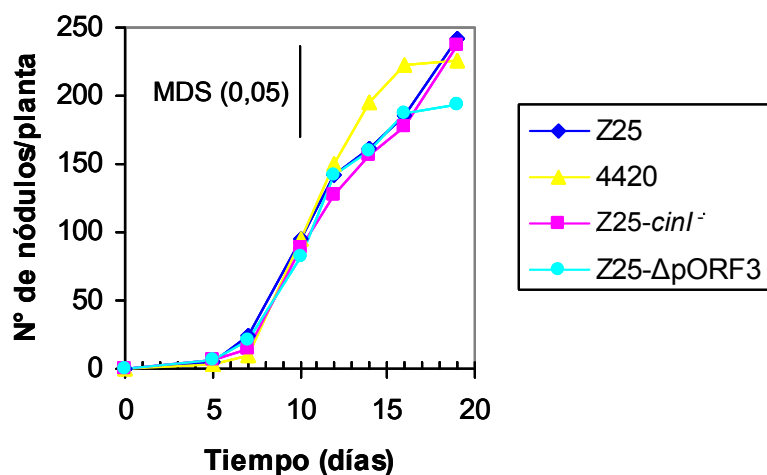


Figura 4.58: Cinética de nodulación de plantas de guisante por las cepas Z25, 4420, Z25-*cinI* y Z25- Δ pORF3. Los valores representan la media de cinco repeticiones. MDS (0,05): mínima diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%.

También se determinó la actividad nitrogenasa en nódulo de las diferentes cepas mediante el ensayo de actividad reductora de acetileno (apartado 3.4.2.). La actividad nitrogenasa se expresó como ARA específica y como ARA por planta. En ambos casos se vio que existía una diferencia significativa entre la cepa 4420 y las cepas Z25 y Z25-*cinI* (Figura 4.59). El valor medio de ARA específica para la cepa 4420 fue 1,67 y 2,24 veces mayor que el valor medio de ARA específica de las cepas Z25 y Z25-*cinI* respectivamente, mientras que el valor medio de ARA por planta para la cepa 4420 fue 1,79 y 2,26 veces mayor que el valor medio de ARA por planta de las cepas Z25 y Z25-*cinI* respectivamente.

Por último, tras desecar los nódulos, la parte aérea y la raíz se registraron los pesos secos de cada fracción. No se observaron diferencias significativas en los pesos secos de nódulos, de partes aéreas y de raíces de las plantas inoculadas con las diferentes cepas (Figura 4.60).

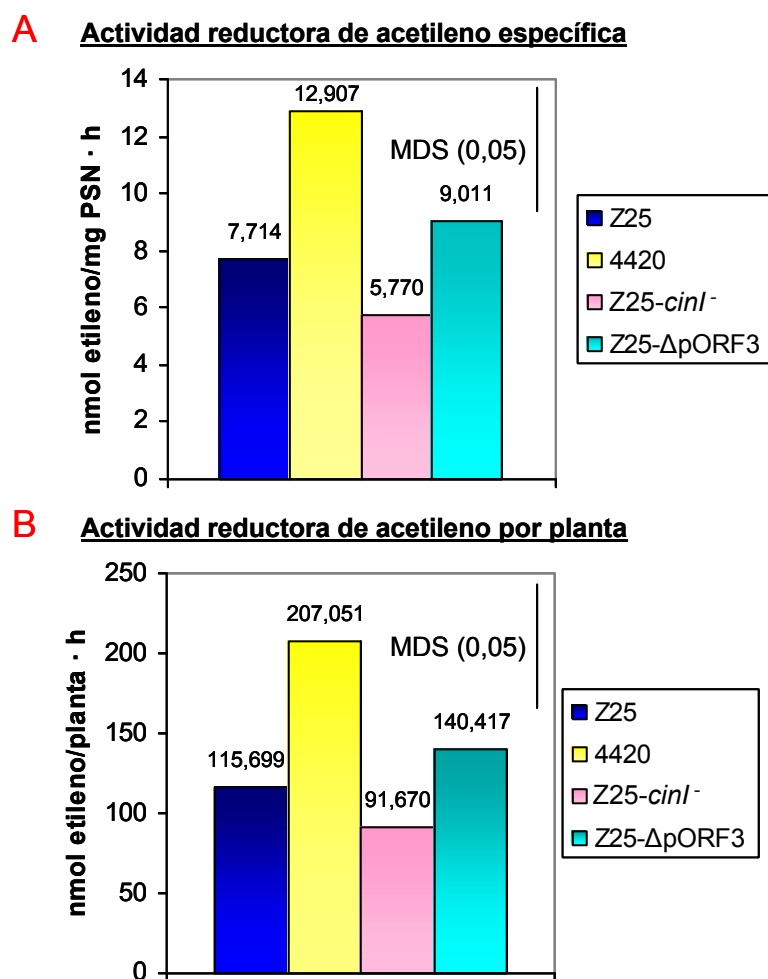


Figura 4.59: Actividad reductora de acetileno específica (nmol etileno/mg peso seco nodular·h) (A) y actividad reductora de acetileno por planta (nmol etileno/planta·h) (B) en plantas de *Pisum sativum* cv. Frisson inoculadas con las cepas Z25, 4420, Z25-*cinI*⁻ y Z25- Δ pORF3 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Los valores representan la media de al menos nueve repeticiones. PSN: peso seco de nódulos. MDS (0,05): mínima diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%.

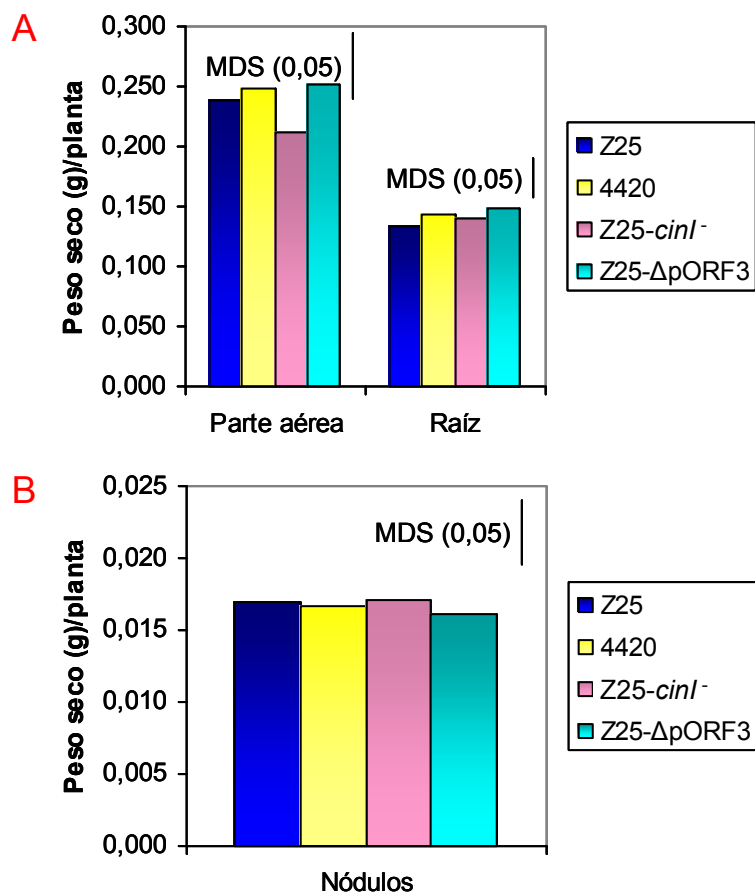


Figura 4.60: Pesos secos (g/planta) de la parte aérea y raíz (A) y de los nódulos (B) de plantas de guisante (*Pisum sativum* cv. Frisson) inoculadas con las cepas Z25, 4420, Z25-*cinI*⁻ y Z25- Δ pORF3 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Los valores representan la media de cinco repeticiones. MDS (0,05): mínima diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%.

4.11.2. Ensayos de competición por la nodulación

Para realizar el ensayo de competición por la nodulación, se inocularon plantas de guisante (*Pisum sativum* cv. Frisson) con mezclas de la cepa Z25 y sus derivadas (4420, Z25-*cinI* y Z25- Δ pORF3) con la cepa M17 Sp^r (sensible a la bacteriocina) de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, tal y como se describe en el apartado 3.3.1 Dos semanas después de la inoculación se llevó a cabo el ensayo de competición por la nodulación (apartado 3.3.3). Con anterioridad al ensayo de competición por la nodulación se había realizado un ensayo de nodulación con plantas inoculadas con la cepa M17 Sp^r, en el que no se observó que existiera una diferencia significativa en el número de nódulos con respecto a plantas inoculadas con la cepa Z25.

En el caso de las plantas inoculadas con la mezcla de las cepas 4420 y M17 Sp^r, se observó que existía una diferencia significativa en los porcentajes de nódulos ocupados por la cepa 4420 y por la cepa M17 Sp^r con respecto a los demás tratamientos. El porcentaje de nódulos ocupados por la cepa 4420 fue un 24,15% inferior al porcentaje de nódulos ocupados por la cepa Z25, mientras que el porcentaje de nódulos ocupados por la cepa M17 Sp^r cuando compitió con la cepa 4420 fue un 24,78% superior al porcentaje de nódulos ocupados por la cepa M17 Sp^r cuando compitió con la cepa Z25. Por otra parte, el porcentaje de infecciones mixtas fue ligeramente superior en las plantas inoculadas con la mezcla de las cepas Z25-*cinI* y M17 Sp^r, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 4.61).

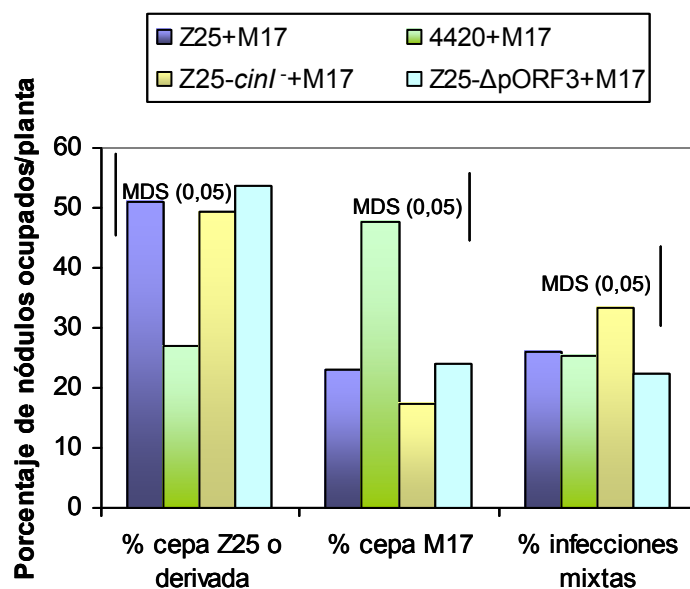


Figura 4.61: Ensayo de competición por la nodulación de plantas de guisante (*Pisum sativum* cv. Frisson) entre la cepa Z25 y sus derivadas (4420, Z25-*cinI* y Z25- Δ pORF3) y la cepa M17 Sp^r. Se muestra el porcentaje de nódulos ocupados por planta para cada una de las cepas de la mezcla empleada para inocular las plantas. Los valores representan la media de al menos cinco repeticiones. MDS (0,05): mínima diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%.

4.12. ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA DE LAS FUSIONES EN CÉLULAS DE *Escherichia coli* MUTANTES EN EL GEN *hns*

Aprovechando que las fusiones *rzcC-lacZ* construidas en este estudio presentan actividad β -galactosidasa en la cepa DH5 α de *Escherichia coli*, tal y como se ve en el apartado 4.7.6, para determinar el posible efecto de la proteína H-NS en la actividad β -galactosidasa de la fusión *rzcC-lacZ* del plásmido pMAGR29, se transfirió dicho plásmido a las cepas TP2101 y BE1522 (*hns*⁻) de *Escherichia coli* por transformación de células competentes de dichas cepas y posterior selección en placas de medio LB Tc y LB Km Tc respectivamente. A continuación se realizó el ensayo de actividad β -galactosidasa según el apartado 3.4.1.2. Como control se emplearon las cepas TP2101 y BE1522 con el plásmido pMP220.

No se observó diferencia significativa en la actividad β -galactosidasa de la fusión *rzcC-lacZ* del plásmido pMAGR29 en función del fondo genético (Figura 4.62).

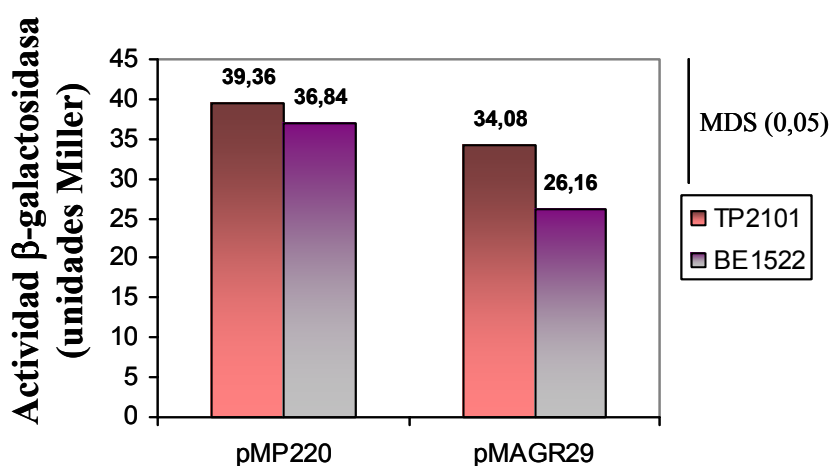


Figura 4.62: Actividad β -galactosidasa de la fusión *rzcC-lacZ* del plásmido pMAGR29 en células de las cepas TP2101 y BE1522 (*hns*⁻) de *Escherichia coli*. Los valores representan la media de tres repeticiones. MDS (0,05): mínima diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%

5. DISCUSIÓN

La cepa Z25 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* fue seleccionada durante el trabajo realizado por Rodelas et al. (1998) en función de su capacidad infectiva y efectiva, y de su potente actividad bacteriocinogénica frente a todas las cepas de *R. leguminosarum* bv. *viciae* utilizadas como indicadores, sin encontrarse efectos inhibitorios sobre otros grupos de microorganismos del suelo. En este trabajo, se ha llevado a cabo la clonación y secuenciación de los genes responsables de la expresión de la bacteriocina de la cepa Z25. Para ello se realizó una mutagénesis al azar de la cepa Z25 con el transposón Tn5, con la que se obtuvieron cuatro mutantes defectivas en la producción de bacteriocina. Al analizar la región adyacente al transposón Tn5, se comprobó que el gen interrumpido guardaba similitud con las proteínas RzcA de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 162Y10 y *R. leguminosarum* bv. *viciae* 248, bacteriocinas de la familia de toxinas RTX producidas por dichas cepas. Para completar la secuenciación de los genes responsables de la producción de la bacteriocina por la cepa Z25, fue necesario recurrir a una estrategia de PCR inversa, debido al gran tamaño que resultó tener el gen *rzcA*.

La presencia de megaplásmidos es frecuente entre las bacterias del género *Rhizobium* y se sabe que juegan un papel importante en la interacción bacteria-planta, ya que la mayoría de los genes relacionados con la nodulación y con la fijación de nitrógeno están codificados por plásmidos (Hynes y Finan, 1998). Asimismo, estos plásmidos con frecuencia portan genes que confieren otros fenotipos que se ha demostrado que son favorables para la persistencia de los rizobios en la rizosfera y la competición por la colonización de la raíz y la ocupación de los nódulos, tales como la producción de melanina, la capacidad de síntesis y/o degradación de sustratos específicos, y la producción de bacteriocinas (Rodelas et al., 2002). El gel de megaplásmidos de la cepa Z25 mostró la existencia de tres megaplásmidos de aproximadamente 150, 360 y más de 370 Mda, estando localizadas las inserciones de Tn5 de las cuatro mutantes defectivas en la producción de bacteriocina en el megaplásmido de 360 MDa. Quedó por tanto demostrado que la bacteriocina de la cepa Z25 está codificada por un megaplásmido (360 MDa), tal y

como ocurre con las rizobiocinas de las cepas 248 y 306 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Oresnik et al., 1999; Venter et al., 2001) y de la cepa 162Y10 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Twelker et al., 1999), que también se encuentran codificadas por megaplásmidos. En el caso de la cepa 248, el megaplásmido en cuestión es el plásmido simbiótico pRL1JI. Aunque durante el desarrollo de este estudio no se ha identificado cual de los tres megaplásmidos que posee la cepa Z25 es el plásmido simbiótico, podría ser de interés identificarlo para determinar si se trata igualmente del megaplásmido que porta la región codificante de la bacteriocina, como ocurre en el caso de la cepa 248. La codificación a nivel plasmídico del carácter productor de bacteriocinas no se restringe al género *Rhizobium*, sino que está muy extendida, tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas (Jack et al., 1995).

Al analizar la secuencia completa de la región responsable de la expresión de la bacteriocina se observaron ocho marcos abiertos de lectura. La secuencia de aminoácidos del ORF1 guardaba la máxima similitud (75%) con una transposasa de *Rhizobium* sp. NGR234, y además se encontró un dominio conservado en transposasas putativas (pfam04986.5) y tres motivos consenso de la familia IS91 (Mahillon y Chandler, 1998; Tavakoli et al., 2000), lo que coincide con los resultados del programa BLASTP. La secuencia de aminoácidos del ORF2 guardaba la máxima similitud (90%) con una integrasa/recombinasa putativa de *Rhizobium* sp. NGR234, y también se encontraron varios dominios conservados en integrasas e incluso residuos conservados posiblemente análogos a los que forman el sitio activo de la recombinasa CRE. La presencia de transposasas e integrasas físicamente cercanas a los genes que codifican la síntesis y secreción de toxinas de la familia RTX, tales como las hemolisinas de cepas de *Escherichia coli*, se ha descrito con frecuencia en la bibliografía (Jubete et al., 1995; Schmidt y Hensel, 2004).

La secuencia aminoacídica del ORF3 guardó cierta similitud con la región amino terminal de varias proteínas histidina quinasas (41-52%) y con la región amino terminal de la proteína *sensory box* de *Shewanella oneidensis* MR-1 (52%). No se encontraron dominios conservados y el análisis predictivo mostró que la proteína codificada por el ORF3 posee cuatro posibles hélices transmembrana y que probablemente esté localizada en la membrana interna. Las proteínas histidina quinasas forman parte del sistema regulador de dos componentes, y en su extremo amino terminal poseen un módulo sensor el cual está formado por un pequeño dominio citoplasmático, una hélice transmembrana, un dominio sensor periplásmico y una segunda hélice transmembrana (Appleman et al., 2003). Las dos primeras hélices transmembrana predichas en la proteína ORF3 podrían coincidir con las hélices transmembrana que flanquean el dominio sensor en las histidina quinasas. Sin embargo, no se encontraron el resto de los dominios que forman parte de las histidina quinasas (Wolanin et al., 2002). Los datos anteriores parecen indicar que el ORF3 es un fragmento de gen, aunque lo que sí parece claro es que posee un promotor, ya que la fusión transcripcional del ORF3 con el gen *lacZ* (pMAGR22) presentó actividad β -galactosidasa tanto en células de la cepa Z25 de *Rhizobium leguminosarum* como en la cepa DH5 α de *Escherichia coli*. No obstante, la mutación en la zona promotora del ORF3 no tiene efecto en la producción de bacteriocinas en placa, por lo que bajo las condiciones de este estudio no se ha podido demostrar que esta proteína esté relacionada con la producción de bacteriocinas.

La región responsable de la producción de bacteriocina cumple algunas, aunque no todas, de las características de las islas de patogenicidad expuestas por Schmidt y Hensel (2004), como son la presencia de la transposasa y de la integrasa, el hecho de portar un gen de virulencia, el tamaño de la región, que se encuentra entre 10 y 200 kb, y el hecho de que existan cepas no patogénicas de la misma especie o de una especie muy relacionada. Además al encontrarse en un megaplásmido y no en el cromosoma no se puede considerar como una isla de patogenicidad en sentido estricto, a pesar de que se ha verificado que

determinados cluster de genes de virulencia se encuentran tanto en las islas de patogenicidad de algunos patógenos como en plásmidos de virulencia de otras bacterias. De hecho, se considera que los plásmidos podrían ser un modo de transferir las islas de patogenicidad entre bacterias. Un ejemplo es el operón de la α -hemolisina de cepas de *Escherichia coli* uropatogénicas, que puede estar localizado en plásmidos o en islas de patogenicidad en el cromosoma, como son las islas PAI I y PAI II (Schmidt y Hensel, 2004). Otra característica de las islas de patogenicidad es que a menudo presentan una estructura de tipo mosaico, en vez de poseer segmentos homogéneos de ADN adquirido por transferencia horizontal. Esto podría explicar la presencia del ORF3 como un fragmento del gen de la histidina quinasa.

La secuencia de aminoácidos del ORF4 guardaba la máxima similitud (85%) con la proteína aciltransferasa RzcC de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* y además se encontraron dominios conservados en las aciltransferasas de toxinas RTX. La mutación por inserción en el gen *rzcC* hace que se dejen de producir bacteriocinas en el ensayo en placa, lo cual es lógico pues la acilación de la protoxina es indispensable para que esta sea activa (Lally et al., 1999).

La secuencia aminoacídica del ORF5 guardaba la máxima similitud (80%) con la rizobiocina RzcA de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 162Y10, la cual pertenece a la familia de toxinas RTX. La proteína RzcA cumple todas las características de las toxinas RTX descritas por Delepelaire (2004): tiene un tamaño de 4334 aminoácidos, su pI es aproximadamente de 4 (3,846), no contiene ningún residuo cisteína y presenta un segundo tipo de repeticiones además de las repeticiones nonapeptídicas ricas en glicina, por lo que parece evidente que se trata de una toxina RTX. Al llevar a cabo el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la bacteriocina de la cepa Z25 con otras secuencias depositadas en bases de datos, se observó que la secuencia está más conservada en la región de las repeticiones ricas en glicina y, en menor medida, al final de la proteína,

donde se encuentra la señal de secreción extracelular en las toxinas RTX. Esto coincide con lo expuesto por Welch (1995), que afirma que la región amino terminal de las toxinas RTX es la que presenta mayor divergencia en la secuencia. Según el análisis predictivo, existen dos posibles hélices transmembrana entre los aminoácidos 340 y 395, siendo esta zona rica en aminoácidos hidrofóbicos, por lo que podría ser parte de la región rica en aminoácidos hidrofóbicos típica de las toxinas RTX, la cual es responsable de la actividad de tipo poro o pseudo-poro (Welch, 2001). Asimismo se encontraron un posible sitio de corte autocatalítico y cinco posibles motivos *EF-hand*, similares a los descritos en la proteína RTX FrpC por Osička et al. (2004). Los motivos anteriores podrían ser responsables de la formación de dímeros y oligómeros como los que se han documentado para las proteínas FrpC de *Neisseria meningitidis* y ApxIVA de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Sin embargo, este extremo debería ser confirmado en estudios posteriores. Por otra parte, se ha encontrado un segundo motivo repetido similar al descrito en las rizobiocinas de la cepa 248 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Oresnik et al., 1999) y de la cepa 162Y10 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Twelker et al., 1999), que se repite con la misma regularidad.

La secuencia de aminoácidos del ORF6 guardaba la máxima similitud (95%) con la proteína de transporte RspD de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 162Y10 (codificada por el gen *rzcD*, que se encuentra a continuación del gen *rzcA*), y además se obtuvieron alineamientos con dominios conservados en la familia de proteínas ABC. En la mitad amino terminal se encontraron cinco posibles hélices transmembrana, lo que coincide con el dominio transmembrana de las proteínas ABC, y en la mitad carboxilo terminal se identificaron los motivos Walker A y Walker B, y el motivo C entre ellos, tal y como ocurre en el dominio de unión a nucleótidos de las proteínas ABC (Dean et al., 2001). Además, según el análisis predictivo esta proteína se encuentra localizada en la membrana interna, lo que también coincide con lo descrito para las proteínas ABC (Dean et al., 2001). Por otra parte, el hecho de que la fusión *rzcD-lacZ* del plásmido pMAGR57 presentara un

nivel muy bajo de actividad β -galactosidasa en células de *R. leguminosarum* bv. *viciae* Z25 parece indicar que el gen *rzcD* no tiene promotor independiente sino que se transcribe en la misma unidad que el gen o genes *rzc* que lo preceden en la secuencia, tal y como ocurre en la mayoría de las toxinas RTX estudiadas a nivel molecular (Lally et al., 1999; Narayanan et al., 2002).

La secuencia aminoacídica del ORF7 guardaba la máxima similitud (96%) con la proteína de transporte RspE de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 162Y10, y se obtuvieron alineamientos con dominios conservados en la familia de proteínas de secreción HlyD (proteínas de fusión de membrana). El análisis predictivo ha mostrado que la proteína tiene propensión a formar estructuras *coil-coiled*, tal y como describe Delepelaire (2004). Se puede pensar que *rzcE* forma parte del mismo operón que *rzcD* por la proximidad existente entre los genes *rzcD* y *rzcE*, ya que el codón de inicio GTG de *rzcE* está superpuesto con el codón de terminación TGA de *rzcD*. Esto también ocurre en los genes que codifican los transportadores de las rizobiocinas 306c de la cepa 306 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y 162Y10 de la cepa 162Y10 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Venter et al., 2001).

La secuencia de aminoácidos del ORF8 guardaba la máxima similitud con la proteína RspF de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 162Y10 (75%) y con una aciltransferasa de *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 (40%). Además se obtuvieron alineamientos con dominios conservados en aciltransferasas, y según el análisis predictivo posee diez hélices transmembrana y está localizada en la membrana interna. El hecho de que el codón de inicio de *rzcF* se encuentre a 6 nucleótidos del codón de terminación del gen *rzcE* hace pensar que *rzcF* puede formar parte de una misma unidad transcripcional con los genes *rzcD* y *rzcE*. Esta situación es similar a lo que ocurre con los genes *rspE* y *rspF* en *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 162Y10, pero en la base de datos de NCBI solo se indica que RspF es similar a proteínas de acilación. Se desconoce si *rspF* forma parte del operón de la bacteriocina y si la proteína que codifica tiene alguna función

relacionada con la expresión de la bacteriocina. Sería necesario llevar a cabo más ensayos para comprobar si *rzcF* forma parte de un operón y dilucidar su función, ya que no se han descrito más casos en bibliografía en los que genes que codifican aciltransferasas diferentes de RtxC formen parte de operones de toxinas RTX.

El análisis de la posible región promotora de los genes *rzcC* y *rzcA* mediante el ensayo de extensión de cebador, mostró que existe un sitio de inicio de transcripción delante del codón de inicio del gen *rzcC* y dos posibles sitios de inicio de transcripción delante del codón de inicio del gen *rzcA*, lo cual se podría explicar por la existencia de dos cajas -10 solapadas así como una caja -10 extendida, si bien no se ha identificado ninguna caja -35 consenso. La presencia de cajas del tipo -10 extendida es común en los genes de *E. coli* que carecen de cajas consenso -35 y que dependen de elementos reguladores activadores de la transcripción (Kumar et al., 1993). En el operón *lktCABD*, que codifica la producción de leucotoxina por *Mannheimia haemolytica*, cerca de dicho promotor con caja-10 extendida, se encuentran varios trectos de adenina (5' CAAAAACA 3') que ejerce una curvatura del ADN, favoreciendo la modulación de los promotores mediante activadores que se unen a secuencias con el consenso TGT-N₍₁₁₋₁₂₎-ACA (Highlander y Weinstock, 1994; Marciel y Highlander, 2001). En la región promotora de *rzcA*, hay una secuencia que cumple con el consenso de los activadores putativos de la transcripción (nucleótidos 6864-6680), así como varias secuencias ricas en A que flanquean en 5' la caja -10 extendida (nucleótidos 6750 a 6921), si bien no cumplen el consenso de los trectos de adenina descritos previamente.

La presencia de regiones promotoras delante de los genes *rzcC* y *rzcA* queda confirmada por los ensayos de actividad β -galactosidasa con la fusión *rzcC-lacZ* del plásmido pMAGR20 y con las fusiones *rzcA-lacZ* de los plásmidos pMAGR17 y pMAGR21. La fusión *rzcC-lacZ* del plásmido pMAGR20 presentó niveles de actividad β -galactosidasa significativamente diferentes de los niveles de actividad de pMP220, tanto en

R. leguminosarum bv. *viciae* Z25 como en *Escherichia coli* DH5 α , lo que confirma la presencia de un promotor delante del inicio del gen *rzcC*. Por otra parte, los niveles de actividad β -galactosidasa de la fusión *rzcA-lacZ* del plásmido pMAGR21 son significativamente diferentes de la actividad de pMP220, lo que confirma la presencia de una segunda región promotora en la zona intergénica *rzcC-rzcA*, tal como mostraron los resultados del análisis de extensión de cebador.

La organización de los genes *rzcCADE* coincide con la del operón típico de las toxinas RTX *rtxCABD*, donde el producto del gen *rtxC* es responsable de la acilación del producto del gen estructural *rtxA* y los productos de los genes *rtxBD* son los encargados del transporte de RtxA (Lally et al., 1999). Este modelo de organización genética también se encuentra en las regiones codificantes de las bacteriocinas 162Y10 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 162Y10 y 306c de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 306 (Venter et al., 2001), pero no en el caso de la bacteriocina de la cepa 248 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, en la que solo se ha encontrado el gen estructural *rzcA* (Oresnik et al., 1999). En el curso de este estudio, no se ha obtenido evidencia directa de que los genes *rzcCADE* o *rzcADE* formen parte de una misma unidad transcripcional, ya que dado el gran tamaño de los posibles transcritos de ARNm, la ejecución de un *Northern blot* o el desarrollo de estrategias de RT-PCR es ciertamente compleja. Los niveles de actividad β -galactosidasa del plásmido pMAGR17 son significativamente mayores que los niveles de actividad de pMAGR21 (aproximadamente un 50% más altos tras 12 h de cultivo, ver Fig. 4.46), lo que podría explicarse por la presencia de las regiones promotoras tanto de *rzcC* como de *rzcA* en el fragmento de ADN clonado en pMAGR17, en el caso de que ambos genes se encuentren en un mismo transcrito de ARNm. En el caso de las rizobiocinas de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 248 y de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 162Y10 descritas en bibliografía, solo se llevaron a cabo ensayos de actividad β -galactosidasa con fusiones

transcripcionales del gen *rzcA*, los cuales sugirieron que en células de vida libre la producción de la rizobiocina probablemente era constitutiva (Venter et al., 2001).

Otro de los objetivos de este estudio fue ver el posible efecto del mecanismo de percepción de quórum en la producción de bacteriocina por la cepa Z25. Para ello se amplificaron por PCR los genes *cinRI*, ya que dichos genes se encuentran en la cima de una cascada que controla al menos otras tres AHL sintetas (Rodelas et al., 1999; Lithgow et al., 2000; Wisniewski-Dye et al., 2002), y el producto de dicha amplificación se clonó en pBluescript II KS (-) para posteriormente ser secuenciado. Al analizar la secuencia se encontraron dos marcos abiertos de lectura. La secuencia aminoacídica del ORF1 guardaba la máxima similitud (98%) con el regulador transcripcional CinR de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 8401, y se obtuvieron alineamientos con dominios conservados en reguladores transcripcionales (dominio hélice-vuelta-hélice y dominio de unión a autoinductor). Al realizar el alineamiento con secuencias de varias proteínas CinR y una proteína BisR del género *Rhizobium*, se observó que la secuencia se encuentra muy conservada. Por otra parte, la secuencia aminoacídica del ORF2 guardaba la máxima similitud (97%) con la proteína CinI de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 8401, y se obtuvieron alineamientos con dominios conservados en proteínas autoinductor sintetasa. El alineamiento de la secuencia de CinI de la cepa Z25 con secuencias de dos proteínas CinI del género *Rhizobium* mostró igualmente que la secuencia está muy conservada. En la región intergénica *cinR-cinI* no se identificaron cajas *lux* ni cajas *tra*, aunque tampoco se encontraron entre los genes *cinR* y *cinI* de *Rhizobium leguminosarum* 8401 (Lithgow et al., 2000).

En el ensayo de cromatografía en capa fina, en el que se empleó como cepa indicadora *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 pZLR4, se observó una reducción o desaparición de cuatro de las AHLs detectadas. Esto se debe a que los genes *cinRI* se encuentran en la cima de una cascada de regulación que controla al menos tres AHL sintetas, por lo que una mutación en *cinI* o en *cinR* además de eliminar la producción de 3-

OH-C_{14:1}-HSL reduce la producción de otras AHLs (Lithgow et al., 2000). En el ensayo en placa que se realizó usando *Chromobacterium violaceum* CV026 como cepa indicadora no se observó halo de pigmentación ni en torno a la cepa Z25 ni a la cepa Z25-*cinI*⁻. La ausencia de halo en la cepa Z25 se podría explicar por una posible inhibición por AHLs de cadena larga (10 o más átomos de carbono), como es la 3-OH-C_{14:1}-HSL, de la inducción de la producción de violaceína por las AHLs de cadena corta y mediana (4 a 8 carbonos) presentes (McClellan et al., 1997). Sin embargo, la ausencia de halo en la mutante *cinI*⁻ se podría explicar por la reducción en la producción de AHLs, ya que la cepa indicadora *Chromobacterium violaceum* CV026 es menos sensible en la detección que *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 pZLR4 (Cha et al., 1998).

A pesar de que los ensayos de actividad β-galactosidasa con fusiones transcripcionales del gen *rzcA* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 248 y de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 162Y10 sugirieron que en células de vida libre la producción de la rizobiocina probablemente es constitutiva (Venter et al., 2001), existen muchos casos en bibliografía en los que se observa que la regulación de la expresión de las toxinas RTX resulta muy compleja, con factores que actúan tanto en *cis* como en *trans* (ver apartado XX de la Introducción). En este estudio, se han construido fusiones transcripcionales tanto con el gen *rzcC* como con el gen *rzcA*, y la cuantificación de la actividad β-galactosidasa de las distintas fusiones indica igualmente que la regulación depende de elementos en *cis* y que es ciertamente compleja.

Se encontró una región de ADN (denominada región R) situada a 1 Kb por encima del codón de inicio del gen *rzcC* (ver Fig. 4.45) que guarda una identidad del 46% con el elemento regulador *hlyR* del operón *hly* de *Escherichia coli*. El elemento *hlyR* es indispensable para activar la expresión de la hemolisina en *E. coli* (Jubete et al., 1995; Madrid et al., 2002). En contra de lo esperado inicialmente para una posible

región de función análoga a *hlyR*, las fusiones pMAGR29 (*rczC-lacZ*) y pMAGR16 (*rczA-lacZ*) no expresaron actividad β -galactosidasa, mientras que las fusiones pMAGR20 (*rczC-lacZ*) y pMAGR17/pMAGR21 (*rczA-lacZ*), que excluyen la región que guardaba identidad con *hlyR*, sí mostraron una actividad β -galactosidasa estadísticamente significativa. Por lo tanto, concluimos que la región R no tiene un papel análogo al de *hlyR* en la expresión de hemolisinas en *E. coli*, sino que por el contrario parece determinar de algún modo un efecto represor. Estos resultados se confirmaron con la construcción de las fusiones pMAGR37 (*rczC-lacZ*) y pMAGR43 (*rczA-lacZ*), ya que la delección de la región R (contenida en un fragmento *Hind*III de 0,8 Kb) desbloqueó la represión de la expresión de actividad β -galactosidasa en ambas fusiones. De igual modo, la sustitución de dicha región R por un fragmento de ADN foráneo de tamaño similar (pMAGR55) también tuvo efecto desrepresor sobre la actividad β -galactosidasa de la fusión *rczC-lacZ*, aunque sin llegar a restaurar los valores obtenidos con la fusión pMAGR20..

El elemento *hlyR* se ha encontrado relacionado con la expresión de hemolisina en *Escherichia coli*, y aunque no se ha esclarecido por completo experimentalmente, se postula que la activación depende de un mecanismo de antiterminación (Madrid et al., 2002). La secuencia *hlyR* de *E. coli* contiene el elemento *ops*, encontrado con frecuencia en operones bacterianos de gran tamaño y responsable de la antiterminación (Baley et al., 1997; Nagy et al., 2001). En la región R, no se ha encontrado ninguna secuencia que cumpla el consenso del elemento *ops*, y el porcentaje de identidad con *hlyR* se limita al 46%.

El requerimiento de elementos genéticos *hlyR* que actúen como potenciadores de la síntesis y secreción de toxinas RTX se ha descrito en cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágicas y enteropatogénicas (Vogel et al., 1988; Hess et al., 1990), así como

en *Vibrio cholerae* (von Mechow et al., 1985). La secuencia activadora de la transcripción suele ser una región rica en AT, que contiene varios motivos de unión a proteína y determinantes de curvatura en el ADN (Vogel et al., 1988). La región *hlyR* puede estar físicamente muy distanciada en el genoma con respecto a los genes cuya transcripción regula (von Mechow et al., 1985).

La cuantificación de la actividad β -galactosidasa de las fusiones del gen *rzcC* permitió identificar un segundo elemento con carácter regulador negativo dentro de la secuencia codificante del gen *rzcC*, comprendido entre las posiciones 6095 y 6249 de la secuencia, constando por tanto de 154 nucleótidos, al que se ha denominado región M. Todas las fusiones de *rzcC* construídas hasta la posición 6095 de la secuencia, independientemente de la posición inicial del fragmento empleado para construir la fusión, mostraron niveles de actividad similares a los de la fusión pMAGR20, en comparación con los bajos niveles de actividad de la fusión pMAGR29, que no muestran diferencia significativa con la actividad β -galactosidasa de pMP220. Se ha descrito en el operón *hly* de *Escherichia coli* la existencia de un elemento de 220 nucleótidos denominado *hlyM*, que se localiza dentro de la secuencia del propio gen *hlyC* (Jubete et al., 1995) y está involucrado en la regulación de la transcripción de los genes *hly* de *Escherichia coli*, actuando como silenciador de la transcripción del operón para la hemolisina. El elemento *hlyM* funciona mediante un mecanismo mediado por varias proteínas reguladoras, incluyendo el regulador general negativo de la transcripción H-NS (Madrid et al., 2002). La secuencia de 154 bp dentro de la región codificante del gen *rzcC* no muestra identidad significativa con *hlyM*.

De este conjunto de resultados se deduce que, bajo las condiciones estudiadas, en la zona promotora de los genes *rzc* de la cepa Z25 existen dos regiones con efecto represor sobre la transcripción de las fusiones *rzcC-lacZ* y *rzcA-lacZ* (región R y región

M) que actúan de manera interdependiente, de manera que la región M es requerida para que exista el efecto represor por parte de la región R, y de igual modo cuando la región R está ausente, es suprimida mediante delección o sustituida por otro fragmento de ADN de tamaño similar, no existe represión por parte por la región M. El hecho de que la sustitución por otro fragmento de tamaño similar elimine la represión sólo parcialmente hace pensar que la función de la región R esté relacionada con el mantenimiento de la distancia entre distintos elementos reguladores o con la curvatura del ADN en la región promotora, hipótesis que precisan de estudios adicionales para ser comprobadas.

En las fusiones en las que se efectuó la delección de la región R (pMAGR37 y pMAGR43), se observó que los niveles de expresión de la actividad β -galactosidasa variaban según patrones diferentes para el gen *rzcC* y el gen *rzcA*. En el caso del gen *rzcC*, la delección de la región R (pMAGR37) supone un importante aumento de la expresión de la actividad β -galactosidasa (más de 150 veces) con respecto a la fusión pMAGR20. Además, este incremento es dependiente de la presencia del gen *cinI*, ya que en el fondo genético de la mutante Z25 *cinI*::Tn5, los niveles de actividad β -galactosidasa de pMAGR37 son similares a los de pMAGR20 (ver Figs. 4.48 y 4.50). En el caso del gen *rzcA*, se obtienen niveles de expresión menos divergentes entre las fusiones pMAGR17 y pMAGR21, en las que la región R está ausente, y en pMAGR43 (delección del fragmento *HindIII* que incluye la región R). Adicionalmente, la mutación en el gen *cinI* no supone cambio alguno en este patrón de expresión (Fig. 4.50). Los resultados obtenidos en el fondo genético de *E. coli* DH5 α fueron análogos a los obtenidos en el fondo genético Z25 *cinI*. Esta cepa de *E. coli* carece de la capacidad de sintetizar AHLs (Surette et al., 1999).

En la región promotora de *rzcC*, aunque próximo al inicio de la transcripción existen zonas de simetría palindrómica, ninguna de ellas guarda el consenso conocido

para las cajas *lux* y *tra*. En otras cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, se han encontrado igualmente secuencias palindrómicas en la región promotora de genes regulados por mecanismos de percepción de quórum (ej. *rhiA/rhiI*) que no cumplen con el consenso, cuya implicación en la unión de los homólogos de LuxR no ha sido esclarecida (Rodelas et al., 1999). Las cajas *lux* y *tra* suelen tener una longitud de simetría de 20 bp y localizarse en torno a 40 nt del inicio del gen regulado por percepción de quórum (Li y Farrand, 2000; Whiteley y Greenberg, 2001).

La mutación en *cinI* sin embargo no afecta sensiblemente a la expresión de la actividad β -galactosidasa por las fusiones del gen *rzcA*. La mutante Z25 *cinI::Tn5* presenta un fenotipo claramente reducido en la producción de bacteriocinas en medios de cultivo sólidos, sin embargo, cuando las cepas compiten en medio líquido con una cepa sensible a la bacteriocina, la mutante *cinI*⁻ se comporta de manera análoga a la cepa parental (Fig. 4.57). Las densidades de población alcanzadas en colonias desarrolladas sobre medios sólidos son lógicamente superiores a las que se obtienen en medios líquidos, por lo que el comportamiento dependiente de la percepción de quórum puede ser no comparable bajo ambas condiciones de cultivo.

Dado el papel que la proteína reguladora general H-NS cumple en la expresión de otras toxinas de la familia RTX (Nieto et al., 2000; Madrid et al., 2002), y aprovechando el hecho de que las fusiones *rzcC-lacZ* y *rzcA-lacZ* expresaban actividad β -galactosidasa en el fondo genético de *Escherichia coli* DH5 α , se decidió efectuar la cuantificación de la actividad β -galactosa empleando como fondo genético una cepa de *E. coli* mutada en el gen *hns* (cepa BE1522) y comparando los niveles de expresión utilizando como control la cepa parental de dicha mutante *hns*⁻ (cepa TP2101) (Krin et al., 2002). Al introducir la fusión pMAGR29 en ambas cepas, no se obtuvieron niveles de actividad β -galactosidasa significativamente diferentes del plásmido control

pMP220, mostrando que la mutación en el gen *hns*⁻ no determina ninguna diferencia en el fondo genético de *E. coli*.

Para evaluar la verdadera implicación de una posible proteína homóloga de H-NS en la regulación de los genes *rzc* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* cepa Z25, sería necesario la búsqueda del gen *hns* en el propio genoma de esta cepa. Como se trató con detalle en el apartado 1.3.1.2 de la Introducción, la proteína H-NS carece de secuencia consenso y su multifuncionalidad se basa en el consenso de su estructura. Para la búsqueda de genes homólogos a *hns* en otras bacterias, la única estrategia factible se basa en la complementación *in vivo* de mutantes *hns*⁻ de *Escherichia coli* usando una genoteca. No se han descrito proteínas similares a H-NS en bacterias de la Familia *Rhizobiaceae*, y tan sólo se han encontrado proteínas con función similar en tres géneros de α -proteobacterias, *Rhodobacter*, *Silicibacter* y *Bordetella* (Tendeng y Bertin, 2003; Alsmark et al., 2004).

Los resultados obtenidos mediante el estudio de la actividad β -galactosidasa de las fusiones construídas en los distintos fondos genéticos han proporcionado información acerca de la presencia de dos elementos en la región promotora de los genes *rzc* con funciones moduladoras en *cis*, que forman parte de un sistema de regulación muy complejo en el que también cumple un papel el gen *cinI* relacionado con el mecanismo de percepción de quorum, y que no ha sido esclarecido completamente mediante los datos aquí obtenidos. El empleo del plásmido pMP220 para el estudio de la expresión genética tiene la ventaja de poder estudiar de forma aislada distintos fragmentos de ADN para la detección de las regiones posiblemente implicadas en la regulación. La detección de estos elementos reguladores ha permitido la construcción de la mutante Z25- Δ pORF3, lo que permite disponer de un fondo genético carente de la región R para efectuar estudios adicionales. En este sentido, consideramos que sería de interés para ampliar el conocimiento acerca de la regulación

de los genes *rzc* la construcción de nuevas fusiones, mediante inserción directa del gen *lacZ* en el megaplásmido nativo.

En la última parte de este estudio, se procedió a evaluar comparativamente las características fenotípicas de las distintas cepas mutantes derivadas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* cepa Z25 que se obtuvieron en el transcurso del trabajo, con el fin de determinar si las mutaciones introducían diferencias en el comportamiento simbiótico y la capacidad competitiva con respecto a la cepa parental.

Los parámetros de la simbiosis se estudiaron en plantas de guisante (*Pisum sativum* cv. Frisson) bajo condiciones axénicas de cultivo. En los ensayos de nodulación no se encontraron diferencias significativas en la cinética de nodulación, el número final de nódulos por planta, ni en los pesos secos de los nódulos, partes aéreas y raíces de las plantas de guisante inoculadas con las cepas Z25, 4420, Z25- Δ pORF3 y Z25-*cinI*⁻. El hecho de que la mutación *cinI* no afecte a los parámetros de la nodulación en *R. leguminosarum* bv. *viciae* cepa Z25 coincide con los resultados expuestos por Lithgow et al. (2000). Estos autores realizaron ensayos de nodulación con plantas de guisante y veza (*Vicia hirsuta*) inoculadas con la mutante *cinI*⁻ de la cepa A34 de *Rhizobium leguminosarum*, y no observaron ninguna diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa parental (Lithgow et al., 2000). No obstante, en el caso de mutantes *cinI*⁻ o *cinR*⁻ de *Rhizobium etli* en simbiosis con plantas de judía se han descrito efectos negativos para la simbiosis muy relevantes, tales como la imposibilidad de completar la diferenciación de los simbiosomas, y la disminución de la actividad nitrogenasa en un 30-40% con respecto a la cepa parental (Daniels et al., 2002). En la cepa Z25-*cinI* se observó una reducción en la actividad nitrogenasa en comparación con la cepa silvestre, aunque no fue estadísticamente significativa. Por otra parte, sí se apreció una diferencia significativa entre los niveles de actividad nitrogenasa de las cepas Z25 y 4420, siendo el valor de ARA por planta para la cepa 4420 1,79 veces mayor que para la cepa Z25.

Este aumento de la actividad nitrogenasa en la cepa 4420 podría tener relación con la supresión de la síntesis de la bacteriocina, lo que le supondría un ahorro energético importante que puede destinar a la síntesis de otras proteínas, como las del complejo enzimático de la nitrogenasa.

En este estudio ha quedado demostrada la importancia de la bacteriocina en la capacidad competitiva por el crecimiento y la nodulación de la cepa Z25. En las experiencias de competición en medio de cultivo líquido, cuando la cepa M17 Sp^r creció en cocultivo con la cepa Z25 o con las mutantes Z25- Δ pORF3 y Z25-*cinI*⁻, sólo fue capaz de dividirse durante las primeras 12 h de cultivo, siendo a partir de ese momento incapaz de incrementar el número de células viables. Sin embargo, se obtuvieron curvas de crecimiento solapadas para la mutante 4420 y la cepa M17 Sp^r, demostrando que la producción de la bacteriocina supone una ventaja competitiva para el crecimiento en medios de cultivo bajo condiciones de laboratorio. Destacar el hecho de que no hubo diferencias significativas entre las curvas de cocultivo de las cepas Z25, Z25- Δ pORF3 y Z25-*cinI*⁻.

Los resultados de estos experimentos muestran que la cepa Z25 es capaz de producir la bacteriocina activa en medio de cultivo líquido TY, y contradicen los datos previamente existentes acerca de la incapacidad para detectar la producción de la bacteriocina por la cepa Z25 en medio de cultivo líquido (Rodelas, 1995). Estos estudios previos se centraron en la detección de la bacteriocina en sobrenadantes de cultivos de la cepa Z25 en medio mínimo (medio Y), por lo que la incapacidad para detectar el compuesto en dichos experimentos podría deberse a la diferente composición del medio de cultivo, ya que este es un factor comúnmente descrito por su influencia sobre la capacidad productora de las cepas bacteriocinogénicas (Tagg et al., 1976).

Cuando se realizaron ensayos de competición por la nodulación en plantas de guisante, se demostró claramente que la capacidad de producir bacteriocinas es un importante determinante de la competitividad de la cepa Z25. Existe una diferencia estadísticamente significativa y muy elevada entre los porcentajes de ocupación de nódulos por las cepas Z25 y 4420 cuando compiten por la nodulación en las plantas de guisante coinoculadas con la cepa M17 Sp^r, de modo que la cepa parental Z25 pasa de dominar en la nodulación, con más del 50% de nódulos ocupados frente a un 25% de la cepa, a ser claramente desplazada por la cepa M17 Sp^r, siendo ocupados tan sólo un 25% de los nódulos por la cepa mutada en el gen *rzcA*, frente a un 47% ocupados por M17 Sp^r (Fig 4.61).

En estudios previos realizados para determinar el papel que la bacteriocinas determinan en la competición entre cepas de *Rhizobium*, se han obtenido resultados muy dispares. Así, los estudios realizados sobre el péptido trifolitoxina han demostrado que se trata de un determinante de la competitividad superior de las cepas que la producen (Triplett y Barta, 1987; Robleto et al., 1997, 1998). Sin embargo, los trabajos acerca de la bacteriocina del tipo RTX producida por *R. leguminosarum* bv. *viciae* cepa 248 indican que sólo cumple un papel poco relevante en la competición por la nodulación (Oresnik et al., 1999), mientras que la bacteriocina del tipo RTX producida por la cepa *R. leguminosarum* bv. *viciae* 306 no parece suponer ninguna ventaja competitiva para la nodulación por dicha cepa (Venter et al., 2001). Estos últimos trabajos concluyen que probablemente las bacteriocinas sean más efectiva cuando las cepas tienen aproximadamente la misma competitividad. También se discute la posibilidad de que se trate de determinantes importantes para mantener el plásmido en las poblaciones bacterianas del suelo.

Nuestros resultados muestran que, bajo las condiciones aplicadas, la producción de bacteriocina determina en gran medida la competitividad de la cepa Z25. No

obstante, el comportamiento antagonista debido a la producción de antimicrobianos bajo condiciones de laboratorio, al igual que la demostración bajo condiciones controladas de otras aptitudes que suponen una ventaja competitiva para determinadas cepas, no siempre son pruebas concluyentes de la reproductibilidad de efectos similares en el suelo (Barran y Bromfield, 1992; Bernard y Werner, 1992), por lo que los resultados de estudios *in vitro* deben ser siempre interpretados con razonable cautela. Adicionalmente, dado que las bases moleculares de la capacidad superior para la competición por la nodulación son aún muy poco conocidas, en una población mixta las cepas sensibles o resistentes a las rizobiocinas pueden diferir en otros muchos aspectos involucrados en la capacidad de competición (Triplett y Barta, 1987).

Las teorías recientes acerca del papel ecológico de las bacteriocinas señalan que en condiciones reales, lejos del ambiente espacialmente estructurado que proporcionan las condiciones de laboratorio, los productores de bacteriocinas han de pagar un precio por la producción de la toxina en forma de coste energético, que no siempre es compensado por los beneficios obtenidos al eliminar las poblaciones con las que compite por el espacio y los nutrientes (Riley y Wertz, 2002). Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, para obtener una medida más real de la magnitud de este determinante de la competición, será preciso completar en el futuro las experiencias aquí realizadas, con estudios diseñados bajo condiciones más similares a las que se pueden encontrar en el suelo.

6. CONCLUSIONES

1. La producción de bacteriocina por la cepa Z25 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* está determinada por los genes *rzcCADE*, los cuales comparten homología con genes que forman parte de operones responsables de la producción de toxinas de la familia RTX. Los genes *rzc* se encuentran localizados en uno de los tres megaplásmidos que posee la cepa Z25 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, con un peso molecular aproximado de 360 MDa.
2. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* cepa Z25 porta homólogos de los genes *cinR* y *cinI* involucrados en mecanismos de percepción de quórum mediados por acil-homoserina lactonas (AHLs). La mutante de la cepa Z25 en el gen *cinI* se ve afectada en la producción de AHLs, observándose una reducción o total disminución en cuatro de las AHLs detectadas mediante cromatografía en capa fina y ensayo biológico con la cepa indicadora *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 pZLR4.
3. Mediante la reacción de extensión de cebador, se han identificado dos regiones promotoras que flanquean en 5' a los genes *rzcC* y *rzcA*, respectivamente, característica que no ha sido descrita con anterioridad en otras cepas del género *Rhizobium* productoras de bacteriocinas de la familia de toxinas RTX.
4. La regulación de la transcripción de los genes *rzc* responde a un modelo complejo en el que influyen varios elementos. La medida de actividad β -galactosidasa de fusiones *rzcC-lacZ* y *rzcA-lacZ* ha mostrado la presencia de dos posibles regiones reguladoras, región R y región M, que actúan en conjunto causando un efecto represor de la transcripción. La delección de la región R, que se encuentra en 5' con respecto a ORF3, ocasiona la desregulación de la actividad β -galactosidasa de la fusión del gen *rzcC-lacZ* del plásmido pMAGR37 que, sin embargo, no se observa en la mutante Z25-*cinI*⁻, por lo que

se demuestra una influencia del mecanismo de percepción de quórum en la producción de bacteriocina. Dicha influencia queda confirmada por la disminución de la producción de bacteriocina en medio sólido por la mutante en *cinI*.

5. La producción de bacteriocina resulta un factor determinante de la competitividad de la cepa Z25 frente a una cepa sensible a la bacteriocina, tanto en el ensayo de competición en medio líquido como en el ensayo de competición por la nodulación de plantas de guisante. La mutante en el gen *rzcA* resulta muy perjudicada al competir con la cepa M17 Sp^r sensible a la bacteriocina, en comparación con la cepa parental.
6. La mutación en el gen *rzcA* no afecta al fenotipo de nodulación de plantas de guisante, aunque sí se observa un aumento significativo de la actividad nitrogenasa en simbiosis. En las mutantes *Z25-cinI*⁻ y *Z25-ΔpORF3* no existe diferencia significativa con la cepa parental en los parámetros de nodulación ni en la fijación simbiótica de nitrógeno.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmadjian, V., y S. Paracer. 1986. *Symbiosis: An Introduction to Biological Associations*. University Press of New England, Hanover, New Hampshire, USA.
- Akatsuka, H., R. Binet, E. Kawai, C. Wandersman, y K. Omori. 1997. Lipase secretion by bacterial hybrid ATP-binding cassette exporters: molecular recognition of the LipBCD, PrtDEF, and HasDEF exporters. *J. Bacteriol.* 179: 4754-4760.
- Allen, O. N., y E. K. Allen. 1981. *The Leguminosae: A Source Book of Characteristics, Uses, and Nodulation*. The University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin.
- Alsmark, C. M., A. C. Frank, E. O. Karlberg, B. A. Legault, D. H. Ardell, B. Canback, A. S. Eriksson, A. K. Naslund, S. A. Handley, M. Huvet, B. La Scola, M. Holmberg, y S. G. Andersson. 2004. The louse-borne human pathogen *Bartonella quintana* is a genomic derivative of the zoonotic agent *Bartonella henselae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 9716-9721.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, y D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Amarger, N., V. Macheret, y G. Laguerre. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 996-1006.
- Ames, P., y K. Bergman. 1981. Competitive advantage provided by bacterial motility in the formation of nodules by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 148: 728-729.
- Amit, R., A. B. Oppenheim, y J. Stavans. 2003. Increased bending rigidity of single DNA molecules by H-NS, a temperature and osmolarity sensor. *Biophys. J.* 84: 2467-2473.
- Amon, P., E. Haas, y M. Sumper. 1998. The sex-inducing pheromone and wounding trigger the same set of genes in the multicellular green alga *Volvox*. *Plant Cell* 10: 781-789.
- Amor, B. B., S. L. Shaw, G. E. Oldroyd, F. Maillet, R. V. Penmetsa, D. Cook, S. R. Long, J. Denarie, y C. Gough. 2003. The *NFP* locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J.* 34: 495-506.
- Andersen, C., C. Hughes, y V. Koronakis. 2001. Protein export and drug efflux through bacterial channel-tunnels. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 412-416.
- Anderson, M. S., y C. R. H. Raetz. 1987. Biosynthesis of lipid A precursors in *Escherichia coli*- cytoplasmic acyltransferase that converts UDP-*N*-acetylglucosamine to UDP-3-*O*-(*R*-3-hydroxymyristoyl)-*N*-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* 262: 5159-5169.
- Andrade, K. L., R. G. Mihara, G. Linderman, y G. J. Bethlenfalvay. 1997. Bacteria from rhizosphere and hydrosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 192: 71-79.
- Angelos, J. A., J. F. Hess, y L. W. George. 2001. Cloning and characterization of a *Moraxella bovis* cytotoxin gene. *Am. J. Vet. Res.* 62: 1222-1228.
- Angelos, J. A., J. F. Hess, y L. W. George. 2003. An RTX operon in hemolytic *Moraxella bovis* is absent from nonhemolytic strains. *Vet. Microbiol.* 92: 363-377.
- Appleman, J. A., y V. Stewart. 2003. Mutational analysis of a conserved signal-transducing element: the HAMP linker of the *Escherichia coli* nitrate sensor NarX. *J. Bacteriol.* 185: 89-97.
- Araujo, R. S., y J. Handelsman. 1990. Characteristics of exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium* spp. with altered nodulation competitiveness. En P. M. Gresshoff, L. E. Roth, G. Stacey, y W. E. Newton (eds.), *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*, p. 247. Chapman and Hall, New York.
- Atlung, T., y H. Ingmer. 1997. H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol. Microbiol.* 24: 7-17.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, y K. Struhl. 1999. *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th ed. John Wiley & Sons, Inc.
- Azam, T. A., A. Iwata, A. Nishimura, S. Ueda, y A. Ishihama. 1999. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.* 181: 6361-6370.
- Azam, T. A., y A. Ishihama. 1999. Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*: sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J. Biol. Chem.* 274: 33105-33113.
- Badaut, C., R. Williams, V. Arluison, E. Bouffartigues, B. Robert, H. Buc, y S. Rimsky. 2002. The degree of oligomerization of the H-NS nucleoid structuring protein is related to specific binding to DNA. *J. Biol. Chem.* 277: 41657-41666.
- Bailey, M. J. A., C. Hughes, y V. Koronakis. 1996. Increased distal gene-transcription by the elongation-factor RfaH, a specialized homolog of NusG. *Mol. Microbiol.* 22: 729-737.

- Bailey, M. J. A., V. Koronakis, T. Schmoll, y C. Hughes. 1992. *Escherichia coli* HlyT protein, a transcriptional activator of hemolysin synthesis and secretion, is encoded by the *rfaH* (*sfrB*) locus required for expression of sex factor and lipopolysaccharide genes. *Mol. Microbiol.* 6: 1003-1012.
- Bailey, M. J., C. Hughes, y V. Koronakis. 1997. RfaH and the *ops* element, components of a novel system controlling bacterial transcription elongation. *Mol. Microbiol.* 26: 845-851.
- Balsalobre, C., A. Juárez, C. Madrid, M. Mouriño, A. Prenafeta, y F. Muñoa. 1996. Complementation of the *hha* mutation in *Escherichia coli* by the *ymoA* gene from *Yersinia enterocolitica*: dependence on the gene dosage. *Microbiology* 142: 1841-1846.
- Banfálvi, Z., E. Kondorosi, y A. Kondorosi. 1985. *Rhizobium meliloti* carries two megaplasmids. *Plasmid* 13: 129-138.
- Bateman, A., y M. Bycroft. 2000. The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *J. Mol. Biol.* 299: 1113-1119.
- Bauer, M. E., y R. A. Welch. 1996. Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 64: 167-175.
- Bauer, W. D., y J. B. Robinson. 2002. Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 234-237.
- Baumann, U., S. Wu, K. M. Flaherty, y D. B. McKay. 1993. Three-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa*: a two-domain protein with a calcium binding parallel β -roll motif. *EMBO J.* 12: 3357-3364.
- Becker, A., S. Ruberg, H. Kuster, A. A. Roxlau, M. Keller, T. Ivashina, H. P. Cheng, G. C. Walker, y A. Puhler. 1997. The 32-kilobase *exp* gene cluster of *Rhizobium meliloti* directing the biosynthesis of galactoglucan: genetic organization and properties of the encoded gene products. *J. Bacteriol.* 179: 1375-1384.
- Beijerinck, M. W. 1888. Die Bakterien der Papilionaceen-Knöllchen. *Bot. Ztg.* 46: 725-735; 741-750; 757-771; 781-790; 797-804. (En Nutman, 1987).
- Beijerinck, M. W., y A. Van Delden. 1902. Über die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung II.* 9: 3-43.
- Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne, y S. Brunak. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340: 783-795.
- Beringer, J. E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 84: 188-198.
- Berthoud, H., J. Frey, y P. Kuhnert. 2002. Characterization of Aqx and its operon: the hemolytic RTX determinant of *Actinobacillus equuli*. *Vet. Microbiol.* 87: 159-174.
- Betsou, F., O. Sismeiro, A. Danchin, y N. Guiso. 1995. Cloning and sequence of the *Bordetella bronchiseptica* adenylate cyclase-hemolysin-encoding gene: comparison with the *Bordetella pertussis* gene. *Gene* 162: 165-166.
- Beynon, J. L., J. E. Beringer, y A. W. B. Johnston. 1980. Plasmids and host-range in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium phaseoli*. *J. Gen. Microbiol.* 120: 421-429.
- Bhagwat, A. A., R. E. Tully, y D. L. Keister. 1991. Isolation and characterization of a competition-defective *Bradyrhizobium japonicum* mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3496-3501.
- Bhuvaneswari, T. V., A. A. Bhagwat, y W. D. Bauer. 1981. Transient susceptibility of root cells in four common legumes to nodulation by rhizobia. *Plant Physiol.* 68: 1144-1149.
- Bhuvaneswari, T. V., B. G. Turgeon, y W. D. Bauer. 1980. Early events in the infection of soybean (*Glycine max* L. Merr.) by *Rhizobium japonicum*. I. Localization of infectible root cells. *Plant Physiol.* 66: 1027-1031.
- Bloch, V., Y. Yang, E. Margeat, A. Chavanieu, M. T. Auge, B. Robert, S. Arold, S. Rimsky, y M. Kochoyan. 2003. The H-NS dimerization domain defines a new fold contributing to DNA recognition. *Nat. Struct. Biol.* 10: 212-218.
- Bloemberg, G. V., R. M. Lagas, S. van Leeuwen, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, B. J. J. Lugtenberg, y H. P. Spaink. 1995. Substrate specificity and kinetic studies of nodulation protein NodL of *Rhizobium leguminosarum*. *Biochemistry* 34: 12712-12720.
- Boardman, B. K., y K. J. Satchell. 2004. *Vibrio cholerae* strains with mutations in an atypical type I secretion system accumulate RTX toxin intracellularly. *J. Bacteriol.* 186: 8137-8143.
- Boehm, D. F., R. A. Welch, e I. S. Snyder. 1990a. Calcium is required for binding of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) to erythrocyte membranes. *Infect. Immun.* 58: 1951-1958.
- Boehm, D. F., R. A. Welch, e I. S. Snyder. 1990b. Domains of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) involved in binding of calcium and erythrocyte membranes. *Infect. Immun.* 58: 1959-1964.

- Bono, J. J., J. Riond, K. C. Nicolaou, N. J. Bockovich, V. A. Estevez, J. V. Cullimore, y R. Ranjeva. 1995. Characterization of a binding site for chemically synthesized lipo-oligosaccharidic NodRm factors in particulate fractions prepared from roots. *Plant J.* 7: 253-260.
- Bornberg-Bauer, E., E. Rivals, y M. Vingron. 1998. Computational approaches to identify leucine zippers. *Nucleic Acids Res.* 26: 2740-2746.
- Borodovsky, M., y J. McIninch. 1993. GeneMark: parallel gene recognition for both DNA strands. *Computers & Chemistry* 17: 123-133.
- Bosse, J. T., H. Janson, B. J. Sheehan, A. J. Beddek, A. N. Rycroft, J. Simon Kroll, y P. R. Langford. 2002. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect.* 4: 225-235.
- Bosworth, A. H., B. T. Breil, y E. W. Triplett. 1993. Production of the anti-rhizobial peptide, trifolixotoxin, in sterile soils by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* T24. *Soil Biol. Biochem.* 25: 829-832.
- Boundy-Mills, K. L., R. M. Kosslak, R. E. Tully, S. G. Pueppke, S. Lohrke, y M. J. Sadowsky. 1994. Induction of the *Rhizobium fredii nod* box-independent nodulation gene *nodJ* requires a functional *nodD1* gene. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7: 305-308.
- Bowra, B. J., y M. J. Dilworth. 1981. Motility and chemotaxis towards sugars in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 126: 231-236.
- Bracco, L., D. Kotlarz, A. Kolb, S. Diekmann, y H. Buc. 1989. Synthetic curved DNA sequences can act as transcriptional activators in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 8: 4289-4296.
- Brandi, A., R. Spurio, C. O. Gualerzi, y C. L. Pon. 1999. Massive presence of the *Escherichia coli* major cold-shock protein CspA under non-stress conditions. *EMBO J.* 18: 1653-1659.
- Breil, B. T., P. W. Ludden, y E. W. Triplett. 1993. DNA sequence and mutational analysis of genes involved in the production and resistance of the antibiotic peptide trifolixotoxin. *J. Bacteriol.* 175: 3693-3702.
- Breil, B. T., y E. W. Triplett. 1993. DNA sequence and analysis of genes involved in the production and resistance of the antirhizobial peptide trifolixotoxin. En R. Palacios, J. Mora, y W. E. Newton (eds.), *New Horizons in Nitrogen Fixation, Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, Vol. 17, p. 599. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Breil, B., J. Borneman, y E. W. Triplett. 1996. A newly discovered gene, *tfuA*, involved in the production of the ribosomally synthesized peptide antibiotic trifolixotoxin. *J. Bacteriol.* 178: 4150-4156.
- Brescia, C. C., M. K. Kaw, y D. D. Sledjeski. 2004. The DNA binding protein H-NS binds to and alters the stability of RNA in vitro and in vivo. *J. Mol. Biol.* 339: 505-514.
- Brewin, N. J., J. E. Beringer, A. V. Buchanan-Wollaston, A. W. B. Johnston, y P. R. Hirsch. 1980. Transfer of symbiotic genes with bacteriocinogenic plasmids in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 116: 261-270.
- Bringhurst, R. M., Z. G. Cardon, y D. J. Gage. 2001. Galactosides in the rhizosphere: utilization by *Sinorhizobium meliloti* and development of a biosensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4540-4545.
- Brogan, J. M., E. T. Lally, K. Poulsen, M. Kilian, y D. R. Demuth. 1994. Regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin expression: analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. *Infect. Immun.* 62: 501-508.
- Bueno, L. C., M. P. Mayer, y J. M. DiRienzo. 1998. Relationship between conversion of localized juvenile periodontitis-susceptible children from health to disease and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin promoter structure. *J. Periodontol.* 69: 998-1007.
- Burton, J. C. 1979. *Rhizobium* species. En H. J. Peppler, y D. Perlman (eds.), *Microbial Technology*, 2ª ed., Vol. 1, Microbial Processes, pp. 29-58. Acad. Press Inc., New York.
- Calvert, H. E., M. K. Pence, M. Pierce, N. S. A. Malik, y W. D. Bauer. 1984. Anatomical analysis of the development and distribution of *Rhizobium* infections in soybeans roots. *Can. J. Bot.* 62: 2375-2384.
- Carmona, M., C. Balsalobre, F. J. Muñoa, M. Mouriño, Y. Jubete, F. de la cruz, y A. Juárez. 1993. *Escherichia coli hha* mutants, DNA supercoiling and expression of the haemolysin genes from the recombinant plasmid pANN202-312. *Mol. Microbiol.* 9: 1011-1018.
- Casida Jr., L. E. 1982. *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32: 339-345.
- Cavaleri, S. J., e I. S. Snyder. 1982. Effect of *Escherichia coli* α -hemolysin on human peripheral leukocyte function in vitro. *Infect. Immun.* 37: 966-974.
- Cha, C., P. Gao, Y. C. Chen, P. D. Shaw, y S. K. Farrand. 1998. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant-associated bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11: 1119-1129.

- Chang, Y. F., D. P. Ma, J. Shi, y M. M. Chengappa. 1993a. Molecular characterization of a leukotoxin gene from a *Pasteurella haemolytica*-like organism, encoding a new member of the RTX toxin family. *Infect. Immun.* 61: 2089-2095.
- Chang, Y. F., J. Shi, D. P. Ma, S. J. Shin, y D. H. Lein. 1993b. Molecular analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX toxin-III gene cluster. *DNA Cell Biol.* 12: 351-362.
- Chang, Y. F., R. Young, D. Post, y D. K. Struck. 1987. Identification and characterization of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect. Immun.* 55: 2348-2354.
- Chang, Y. F., R. Young, y D. K. Struck. 1989. Cloning and characterization of a hemolysin gene from *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *DNA* 8: 635-647.
- Chen, W. X., E. Wang, S. Wang, Y. Li, X. Chen, e Y. Li. 1995. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 153-159.
- Chen, W. X., G. S. Li, Y. L. Qi, E. T. Wang, H. L. Yuan, y J. L. Li. 1991. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 275-280.
- Chen, W. X., Z. Y. Tan, J. L. Gao, Y. Li, y E. T. Wang. 1997. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 870-873.
- Chervaux, C., e I. B. Holland. 1996. Random and directed mutagenesis to elucidate the functional importance of helix II and F-989 in the C-terminal secretion signal of *Escherichia coli* hemolysin. *J. Bacteriol.* 178: 1232-1236.
- Chun, J. Y., y G. Stacey. 1994. A *Bradyrhizobium japonicum* gene essential for nodulation competitiveness is differentially regulated from two promoters. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7: 248-255.
- Clementz, T., Z. M. Zhou, y C. R. H. Raetz. 1997. Function of the *Escherichia coli* *msbB* gene, a multicopy suppressor of *htrB* knockouts, in the acylation of lipid A: acylation by MsbB follows laurate incorporation by HtrB. *J. Biol. Chem.* 272: 10353-10360.
- Coleman, J., y C. R. H. Raetz. 1988. First committed step of lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*: sequence of the *lpxA* gene. *J. Bacteriol.* 170: 1268-1274.
- Conn, H. J. 1938. Taxonomic relationships of certain non-sporeforming rods in soil. *J. Bacteriol.* 36: 320-321.
- Conn, H. J. 1942. Validity of the genus *Alcaligenes*. *J. Bacteriol.* 44: 353-360.
- Cornelis, G. R., C. Sluiter, I. Delor, D. Gelb, K. Kaninga, C. Lambert de Rouvroit, M. P. Sory, J. C. Vanooteghem, y T. Michaelis. 1991. *ymoA*, a *Yersinia enterocolitica* chromosomal gene modulating the expression of virulence functions. *Mol. Microbiol.* 5: 1023-1034.
- Cross, M. A., V. Koronakis, P. L. D. Stanley, y C. Hughes. 1990. HlyB dependent secretion of hemolysin by uropathogenic *Escherichia coli* requires conserved sequences flanking the chromosomal *hly* determinant. *J. Bacteriol.* 172: 1217-1224.
- Cubo, M. T., A. Economou, G. Murphy, A. W. Johnston, y J. A. Downie. 1992. Molecular characterization and regulation of the rhizosphere-expressed genes *rhiABCR* that can influence nodulation by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *J. Bacteriol.* 174: 4026-4035.
- Cullimore, J. V., R. Ranjeva, y J. J. Bono. 2001. Perception of lipo-chitoooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci.* 6: 24-30.
- Dame, R. T., C. Wyman, R. Wurm, R. Wagner, y N. Goosen. 2002. Structural basis for H-NS-mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at the *rrnB* P1. *J. Biol. Chem.* 277: 2146-2150.
- Dame, R. T., C. Wyman, y N. Goosen. 2001. Structural basis for preferential binding of H-NS to curved DNA. *Biochimie* 83: 231-234.
- Dangeard, P. A. 1926. Recherches sur les tubercles radicaux des Légumineuses. *Botaniste (Paris)* 16: 1-275.
- Daniels, R., D. E. De Vos, J. Desair, G. Raedschelders, E. Luyten, V. Rosemeyer, C. Verreth, E. Schoeters, J. Vanderleyden, y J. Michiels. 2002. The *cin* quorum sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. *J. Biol. Chem.* 277: 462-468.
- Daniels, R., D. E. De Vos, J. Desair, G. Raedschelders, E. Luyten, V. Rosemeyer, C. Verreth, E. Schoeters, J. Vanderleyden, y J. Michiels. 2002. The *cin* quorum sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. *J. Biol. Chem.* 277: 462-468.
- Danino, V. E., A. Wilkinson, A. Edwards, y J. A. Downie. 2003. Recipient-induced transfer of the symbiotic plasmid pRL1J1 in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is regulated by a quorum-sensing relay. *Mol. Microbiol.* 50: 511-525.

- Daw, M. A., y F. R. Falkner. 1996. Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron* 27: 467-479.
- de Kievit, T. R., R. Gillis, S. Marx, C. Brown, y B. H. Iglewski. 2001. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1865-1873.
- de la Cruz, F., M. Carmona, y A. Juárez. 1992. The Hha protein from *Escherichia coli* is highly homologous to the YmoA protein from *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* 6: 3451-3452.
- de Lajudie, P., A. Willems, B. Pot, D. Dewettinck, G. Maestrojuan, M. Neyra, M. D. Collins, B. Dreyfus, K. Kersters, y M. Gillis. 1994. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 715-733.
- de Lajudie, P., A. Willems, G. Nick, F. Moreira, F. Molouba, B. Hoste, U. Torck, M. Neyra, M. D. Collins, K. Lindström, B. Dreyfus, y M. Gillis. 1998. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 369-382.
- de Maagd, R. A., A. H. Wijffjes, H. P. Spaink, J. E. Ruiz-Sainz, C. A. Wijffelman, R. J. Okker, y B. J. Lugtenberg. 1989. *nodO*, a new nod gene of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* sym plasmid pRL1J1, encodes a secreted protein. *J. Bacteriol.* 171: 6764-6770.
- Dean, M., A. Rzhetsky, y R. Allikmets. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 11: 1156-1166.
- Dean, M., A. Rzhetsky, y R. Allikmets. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 11: 1156-1166.
- Debelle, F., C. Plaz Janet, P. Roche, C. Pujol, A. Savagnac, C. Rosenberg, J. C. Prome, y J. Denarie. 1996. The NodA proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the N-acylation of Nod factors by different fatty acids. *Mol. Microbiol.* 22: 303-314.
- Deighan, P., A. Free, y C. J. Dorman. 2000. A role for the *Escherichia coli* H-NS-like protein StpA in OmpF porin expression through modulation of *micF* RNA stability. *Mol. Microbiol.* 38: 126-139.
- Deighan, P., C. Beloin, y C. J. Dorman. 2003. Three-way interactions among the Sfh, StpA and H-NS nucleoid-structuring proteins of *Shigella flexneri* 2a strain 2457T. *Mol. Microbiol.* 48: 1401-1416.
- Deleage, G., C. Blanchet, y C. Geourjon. 1997. Protein structure prediction. Implications for the biologist. *Biochimie* 79: 681-686.
- Deleplaire, P. 2004. Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1694: 149-161.
- Denarie, J., F. Debelle, y C. Rosenberg. 1992. Signaling and host range variation in nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 497-531.
- Denny, T. P. 1999. Autoregulator-dependent control of extracellular polysaccharide production in phytopathogenic bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 417-430.
- Dersch, P., K. Schmidt, y E. Bremer. 1993. Synthesis of the *Escherichia coli* K-12 nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is subjected to growth-phase control and autoregulation. *Mol. Microbiol.* 8: 875-889.
- Devine, J. H., C. Countryman, y T. O. Baldwin. 1988. Nucleotide sequence of the *luxR* and *luxI* genes and structure of the primary regulatory region of the *lux* regulon of *Vibrio fischeri* ATCC 7744. *Biochemistry* 27: 837-842.
- Devine, J. H., G. S. Shadel, y T. O. Baldwin. 1989. Identification of the operator of the *lux* regulon from the *Vibrio fischeri* strain ATCC 7744. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5688-5692.
- Dinh, T., I. T. Paulsen, y M. H. Saier Jr. 1994. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 176: 3825-3831.
- Döbereiner, J., y F. O. Pedrosa. 1987. Nitrogen-Fixing Bacteria in Non Leguminous Crop Plants. Science Tech. Publishers, Madison, Wisconsin, USA/ Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Dodd, I. B., y J. B. Egan. 1990. Improved detection of helix-turn-helix DNA-binding motifs in protein sequences. *Nucleic Acids Res.* 18: 5019-5026.
- Dole, S., V. Nagarajavel, y K. Schnetz. 2004. The histone-like nucleoid structuring protein H-NS represses the *Escherichia coli* *bgl* operon downstream of the promoter. *Mol. Microbiol.* 52: 589-600.
- Donato, G. M., y T. H. Kawula. 1998. Enhanced binding of altered H-NS protein to flagellar rotor protein FliG causes increased flagellar rotational speed and hypermotility in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 273: 24030-24036.

- Dorman, C. J. 2002. DNA topology and regulation of bacterial gene expression. En D. A. Hodgson, y C. M. Thomas. (eds.), *Signals, Switches, Regulons and Cascades: Control of Bacterial Gene Expression*, pp. 41-56. Cambridge University Press, Cambridge.
- Dorman, C. J. 2004. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 391-400.
- Dorman, C. J., J. C. Hinton, y A. Free. 1999. Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid-associated proteins in bacteria. *Trends Microbiol.* 7: 124-128.
- Dorman, C. J., S. McKenna, y C. Beloin. 2001. Regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*, a facultative intracellular pathogen. *Int. J. Med. Microbiol.* 291: 89-96.
- Dorman, C. J., y P. Deighan. 2003. Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13: 179-184.
- Dowling, D. N., y W. J. Broughton. 1986. Competition for nodulation of legumes. *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 131-157.
- Downie, J. A. 1998. Functions of rhizobial nodulation genes. En H. P. Spaink, A. Kondorosi, y P. J. J. Hooykaas (eds.), *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*, pp. 387-402. Kluwer Academy Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Downie, J. A., C. D. Knight, y A. W. B. Johnston. 1985. Identification of genes and gene products involved in nodulation of peas by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Gen. Genetics* 198: 255-262.
- Dreyfus, B., J. L. Garcia, y M. Gillis. 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 89-98.
- DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). 2005. *Bacterial Nomenclature Up-To-Date*. Braunschweig, Germany. Extraído el 2 de Marzo de 2005 de <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>.
- Eckhardt, M. M., I. R. Baldwin, y E. B. Fred. 1931. Studies on the root-nodule bacteria of *Lupinus*. *J. Bacteriol.* 21: 273-285.
- Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1: 584-588.
- Economou, A., W. D. Hamilton, A. W. Johnston, y J. A. Downie. 1990. The *Rhizobium* nodulation gene *nodO* encodes a Ca²⁺-binding protein that is exported without N-terminal cleavage and is homologous to haemolysin and related proteins. *EMBO J.* 9: 349-354.
- Elasri, M., S. Delorme, P. Lemanceau, G. Stewart, B. Laue, E. Glickmann, P. M. Oger, e Y. Dessaux. 2001. Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soilborne *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1198-1209.
- Elkan, G. H. 1992. Taxonomy of the rhizobia. *Can. J. Microbiol.* 38: 446-450.
- Endre, G., A. Kereszt, Z. Kevei, S. Mihacea, P. Kaló, y G. B. Kiss. 2002. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417: 962-966.
- Engelbrecht, J., y M. Silverman. 1984. Identification of the genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4154-4158.
- Engelbrecht, J., y M. Silverman. 1987. Nucleotide sequence of the regulatory locus controlling expression of bacterial genes for bioluminescence. *Nucleic Acids Res.* 15: 10455-10467.
- Esseling, J. J., y A. M. Emons. 2004. Dissection of Nod factor signalling in legumes: cell biology, mutants and pharmacological approaches. *J. Microsc.* 214: 104-113.
- Estrem, S. T., W. Ross, T. Gaal, Z. W. S. Chen, W. Niu, R. H. Ebright, y R. L. Gourse. 1999. Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase β -subunit. *Genes Dev.* 13: 2134-2147.
- Etzler, M. E., G. Kalsi, N. N. Ewing, N. J. Roberts, R. B. Day, y J. B. Murphy. 1999. A Nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4704-4709.
- Falconi, M., A. Brandi, A. La Teana, C. O. Gualerzi, y C. L. Pon. 1996. Antagonistic involvement of Fis and H-NS proteins in the transcriptional control of *hns* expression. *Mol. Microbiol.* 19: 965-975.
- Falconi, M., B. Colonna, G. Prosseda, G. Micheli, y C. O. Gualerzi. 1998. Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of *virF* promoter to transcriptional repressor H-NS. *EMBO J.* 17: 7033-7043.
- Falconi, M., G. Prosseda, M. Giangrossi, E. Beghetto, y B. Colonna. 2001. Involvement of Fis in the H-NS-mediated regulation of *virF* gene of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 42: 439-452.

- Falconi, M., N. P. Higgins, R. Spurio, C. L. Pon, y C. O. Gualerzi. 1993. Expression of the gene encoding the major bacterial nucleotide protein H-NS is subject to transcriptional auto-repression. *Mol. Microbiol.* 10: 273-282.
- Farrand, S. K., P. van Berkum, y P. Oger. 2003. *Agrobacterium* is a definable genus of the family *Rhizobiaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1681-1687.
- Felmlee, T., S. Pellett, y R. A. Welch. 1985. Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. *J. Bacteriol.* 163: 94-105.
- Feng, J., Q. Li, H. L. Hu, X. C. Chen, y G. F. Hong. 2003. Inactivation of the *nod* box distal half-site allows tetrameric NodD to activate *nodA* transcription in an inducer-independent manner. *Nucleic Acids Res.* 31: 3143-3156.
- Figurski, D. H., y D. R. Helinski. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1648-1652.
- Finnie, C., A. Zorreguieta, N. M. Hartley, y J. A. Downie. 1998. Characterization of *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide glycanases that are secreted via a type I exporter and have a novel heptapeptide repeat motif. *J. Bacteriol.* 180: 1691-1699.
- Fisher, R. F., y S. R. Long. 1993. Interactions of NodD at the *nod* Box: NodD binds to two distinct sites on the same face of the helix and induces a bend in the DNA. *J. Mol. Biol.* 233: 336-348.
- Fong, K. P., W. O. Chung, R. J. Lamont, y D. R. Demuth. 2001. Intra- and interspecies regulation of gene expression by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LuxS. *Infect. Immun.* 69: 7625-7634.
- Foster, R. C., A. D. Rovira, y T. W. Cock. 1983. Ultrastructure of the Root-Soil Interface. The American Phytopathological Society, St Paul, MN, p. 157.
- Frank, B. 1889. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 7: 332-346. (En Elkan, 1992).
- Frasse, N., F. Couderc, y V. Poinso. 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* 270: 1365-1380.
- Fred, E. B., I. L. Baldwin, y E. McCoy. 1932. Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin Studies in Sciences, nº 5. University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin.
- Free, A., M. E. Porter, P. Deighan, y C. J. Dorman. 2001. Requirement for the molecular adapter function of StpA at the *Escherichia coli* *bgl* promoter depends on the level of truncated H-NS protein. *Mol. Microbiol.* 42: 903-918.
- Free, A., y C. J. Dorman. 1995. Coupling of *Escherichia coli* *hns* mRNA levels to DNA synthesis by autoregulation: implications for growth phase control. *Mol. Microbiol.* 18: 101-113.
- Free, A., y C. J. Dorman. 1997. The *Escherichia coli* *stpA* gene is transiently expressed during growth in rich medium and is induced in minimal medium and by stress conditions. *J. Bacteriol.* 179: 909-918.
- Freiberg, C., R. Fellay, A. Bairoch, W. J. Broughton, A. Rosenthal, y X. Perret. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 387: 394-401.
- Frey, J. 1995. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol.* 3: 257-261.
- Frey, J., A. Haldimann, J. Nicolet, A. Boffini, y P. Prentki. 1994. Sequence analysis and transcription of the *apxI* operon (haemolysin I) from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene* 142: 97-102.
- Frey, J., y P. Kuhnert. 2002. RTX toxins in *Pasteurellaceae*. *Int. J. Med. Microbiol.* 292: 149-158.
- Fuqua, C., S. C. Winans, y E. P. Greenberg. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional factors. *Ann. Rev. Microbiol.* 50: 727-751.
- Gage, D. J. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 280-300.
- Gage, D. J., y W. Margolin. 2000. Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 613-617.
- Gagnon, H., y R. K. Ibrahim. 1998. Aldonic acids: a novel family of *nod* gene inducers of *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium lupini*, and *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11: 988-998.
- Gangola, P., y B. P. Rosen. 1987. Maintenance of intracellular calcium in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262: 12570-12574.

- Gao, J. L., S. L. Turner, F. L. Kan, E. T. Wang, Z. Y. Tan, Y. H. Qiu, J. Gu, Z. Terefework, J. P. Young, K. Lindstrom, y W. X. Chen. 2004. *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2003-2012.
- Gardel, C. L., y J. J. Mekalanos. 1994. Regulation of cholera toxin by temperature, pH and osmolarity. *Methods Enzymol.* 235: 517-526.
- Gardy, J. L., M. R. Laird, F. Chen, S. Rey, C. J. Walsh, M. Ester, y F. S. L. Brinkman. 2005. PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics* 21: 617-623.
- Garrity, G. M., M. Winters, y D. B. Searles. 2001. Taxonomic Outline of the Prokaryotic Genera. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª ed. Springer-Verlag, New York, USA. Extraído el 2 de Marzo de 2005 de <http://www.cme.msu.edu/bergeys/april2001-genus.pdf>
- Gaworzewska, E. T., y M. J. Carlile. 1982. Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. *J. Gen. Microbiol.* 128: 1179-1188.
- Gentschev, I., G. Dietrich, y W. Goebel. 2002. The *E. coli* α -hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol.* 10: 39-45.
- George, M. L. C., y F. M. Robert. 1991. Autoregulatory response of *Phaseolus vulgaris* L. to symbiotic mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2687-2692.
- Gillis, M., y J. De Ley. 1980. Intra- and intergeneric similarities of the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Acetobacter* and *Gluconobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30: 7-27.
- Gish, W., y D. J. States. 1993. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat. Genet.* 3: 266-272.
- Glaser, P., D. Ladant, O. Sezer, F. Pichot, A. Ullmann, y A. Danchin. 1988. The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: cloning and expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 2: 19-30.
- González, J. E., y M. M. Marketon. 2003. Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 574-592.
- Göttfert, M. 1993. Regulation and function of rhizobial nodulation genes. *FEMS Microbiol. Rev.* 10: 39-63.
- Göttfert, M., P. Grob, y H. Hennecke. 1990. Proposed regulatory pathway encoded by the *nodV* and *nodW* genes, determinants of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 2680-2684.
- Gourse, R. L., W. Ross, y T. Gaal. 2000. UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol. Microbiol.* 37: 687-695.
- Gratia, A., 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *C. R. Soc. Biol.* 93: 1040-1042. (En Daw y Falkiner, 1996).
- Gray, J. T., P. J. Fedorkacray, y D. G. Rogers. 1995. Partial characterization of a *Moraxella bovis* cytolysin. *Vet. Microbiol.* 43: 183-196.
- Gray, K. M., J. P. Pearson, J. A. Downie, B. E. A. Boboye, y E. P. Greenberg. 1996. Cell-to-cell signalling in the symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium leguminosarum*: autoinduction of a stationary phase and rizosphere-expressed genes. *J. Bacteriol.* 178: 372-376.
- Gray, L., K. Baker, B. Kenny, N. Mackman, R. Haigh, e I. B. Holland. 1989. A novel C-terminal signal sequence targets *Escherichia coli* haemolysin directly to the medium. *J. Cell Sci. Suppl.* 11: 45-57.
- Gunn, C. R., J. H. Wiersema, C. A. Ritchie, y J. H. Kirkbride Jr. 1992. Families and genera of spermatophytes recognized by the Agricultural Research Service. United States Department of Agriculture Technical Bulletin 1796: 1-500.
- Guthmiller, J. M., E. T. Lally, y J. Korostoff. 2001. Beyond the specific plaque hypothesis: are highly leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* a paradigm for periodontal pathogenesis? *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 12: 116-124.
- Gygi, D., J. Nicolet, C. Hughes, y J. Frey. 1992. Functional analysis of the Ca²⁺ regulated hemolysin I operon of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype I. *Infect Immun.* 60: 3059-3064.
- Hacker, J., C. Hughes, H. Hof, y W. Goebel. 1983. Cloned hemolysin genes from *Escherichia coli* that cause urinary tract infection determine different levels of toxicity in mice. *Infect. Immun.* 42: 57-63.
- Hackett, M., L. Guo, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, y E. L. Hewlett. 1994. Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science* 266: 433-435.

- Hadri, A. E., H. P. Spaink, T. Bisseling, y N. J. Brewin. 1998. Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. En H. P. Spaink, A. Kondorosi, y P. J. J. Hooykaas (eds.), *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*, pp. 347-360. Kluwer Academy Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Hafeez, F. Y., F. I. Naeem, R. Naeem, A. H. Zaidi, y K. A. Malik. 2004. (En prensa). Symbiotic effectiveness and bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolated from agriculture soils in Faisalabad. *Environ. Exp. Bot.* Disponible en <http://www.sciencedirect.com>.
- Hahn, H. P., y B. -U. von Specht. 2003. Secretory delivery of recombinant proteins in attenuated *Salmonella* strains: potential and limitations of Type I protein transporters. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 37: 87-98.
- Hahn, M., y D. Studer. 1986. Competitiveness of a *nif-Bradyrhizobium japonicum* mutant against the wild type strain. *FEMS Microbiol. Lett.* 33: 143-148.
- Hahn, M., y H. Hennecke. 1988. Cloning and mapping of a novel nodulation region from *Bradyrhizobium japonicum* by genetic complementation of a deletion mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 55-61.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Handelsman, J., R. A. Ugalde, y W. J. Brill. 1984. *Rhizobium meliloti* competitiveness and the alfalfa agglutinin. *J. Bacteriol.* 157: 703-707.
- Hanzelka, B. L. y E. P. Greenberg. 1996. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: evidence that S-adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis. *J. Bacteriol.* 178: 5291-5294.
- Haraszthy, V. I., G. Hariharan, E. M. Tinoco, J. R. Cortelli, E. T. Lally, E. Davis, y J. J. Zambon. 2000. Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. *J. Periodontol.* 71: 912-922.
- Hardie, K. R., J. P. Issartel, E. Koronakis, C. Hughes, y V. Koronakis. 1991. In vitro activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature membrane-targeted toxin requires HlyC and a low molecular weight cytosolic polypeptide. *Mol. Microbiol.* 5: 1669-1679.
- Hardman, A. M., G. S. Stewart, y P. Williams. 1998. Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 74: 199-210.
- Hashem, F. M., J. S. Angle, y P. A. Ristiano. 1986. Isolation and characterization of rhizobiophages specific for *Bradyrhizobium japonicum* USDA 117. *Can. J. Bot.* 32: 326-329.
- Hashem, F. M., y J. S. Angle. 1988. Rhizobiophage effects on *Bradyrhizobium japonicum*, nodulation and soybean growth. *Soil Biol. Biochem.* 20: 69-73.
- Haubek, D., O. K. Ennibi, K. Poulsen, S. Poulesen, N. Benzarti, y M. Kilian. 2001. Early-onset periodontitis in Morocco is associated with the highly leukotoxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Dent. Res.* 80: 1580-1583.
- He, T., T. Nishihara, D. R. Demuth, e I. Ishikawa. 1999. A novel insertion sequence increases the expression of leukotoxicity in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* clinical isolates. *J. Periodontol.* 70: 1261-1268.
- Heger, A., y L. Holm. 2000. Rapid automatic detection and alignment of repeats in protein sequences. *Proteins* 41: 224-237.
- Herlache, T. C., y E. W. Triplett. 2002. Expression of a crown gall biological control phenotype in an avirulent strain of *Agrobacterium vitis* by addition of the trifoliotoxin production and resistance genes. *BMC Biotechnol.* 2: 2.
- Hess, J., W. Wels, M. Vogel, y W. Goebel. 1986. Nucleotide sequence of a plasmid encoded hemolysin determinant and its comparison with a corresponding chromosomal hemolysin sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* 34: 1-11.
- Hewlett, E. L., L. Gray, M. Allietta, I. Ehrmann, V. M. Gordon, y M. C. Gray. 1991. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Conformational change associated with toxin activity. *J. Biol. Chem.* 266: 17503-17508.
- Highlander, S. K., E. A. Wickersham, O. Garza, y G. M. Weinstock. 1993. Expression of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin is inhibited by a locus that encodes an ATP-binding cassette homolog. *Infect. Immun.* 61: 3942-3951.
- Highlander, S. K., M. J. Engler, y G. M. Weinstock. 1990. Secretion and expression of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *J. Bacteriol.* 172: 2343-2350.
- Highlander, S. K., y G. M. Weinstock. 1994. Static DNA bending and protein interactions within the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin promoter region: development of an activation model for leukotoxin transcriptional control. *DNA Cell Biol.* 13: 171-181.
- Highlander, S. K., y V. T. Hang. 1997. A putative leucine zipper activator of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin transcription and the potential for modulation of its synthesis by slipped-strand mispairing. *Infect. Immun.* 65: 3970-3975.

- Hildebrand, E. M. 1940. Cane gall of brambles caused by *Phytomonas* n. sp. J. Agric. Res. 61: 685-696.
- Hinton, J. C., D. S. Santos, A. Seirafi, C. S. Hulton, G. D. Pavitt, y C. F. Higgins. 1992. Expression and mutational analysis of the nucleoid-associated protein H-NS of *Salmonella typhimurium*. Mol. Microbiol. 6: 2327-2337.
- Hirokawa, T., S. Boon-Chieng, y S. Mitaku. 1998. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. Bioinformatics 14: 378-379.
- Hirsch, A. M. 1992. Tansley review no. 40: developmental biology of legume nodulation. New Phytol. 122: 211-237.
- Hirsch, A. M., M. R. Lum, y J. A. Downie. 2001. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? Plant Physiol. 127: 1484-1492.
- Hirsch, P. R. 1979. Plasmid-determined bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 113: 219-228.
- Hoang, T. T., S. A. Sullivan, J. K. Cusick, y H. P. Schweizer. 2002. Beta-ketoacyl acyl carrier protein reductase (FabG) activity of the fatty acid biosynthetic pathway is a determining factor of 3-oxo-homoserine lactone acyl chain lengths. Microbiology 148: 3849-3856.
- Hobbs, M., y P. R. Reeves. 1994. The JUMPstart sequence: a 39 bp element common to several polysaccharide gene clusters. Mol. Microbiol. 12: 855-856.
- Hodgson, A. L. M., W. P. Roberts, y J. S. Waid. 1985. Regulated nodulation of *Trifolium subterraneum* inoculated with bacteriocin-producing strains of *Rhizobium trifolii*. Soil Biol. Biochem. 17: 475-478.
- Holland, I. B. 2004. Translocation of bacterial proteins: an overview. Biochim. Biophys. Acta 1694: 5-16.
- Holland, I. B., M. A. Blight, y B. Kenny. 1990. The mechanism of secretion of hemolysin and other polypeptides from Gram-negative bacteria. J. Bioenerg. Biomembr. 22: 473-491.
- Holland, I. B., y M. A. Blight. 1999. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. J. Mol. Biol. 293: 381-399.
- Hommais, F., E. Krin, C. Laurent-Winter, O. Soutourina, A. Malpertuy, J. P. LeCaer, A. Danchin, y P. Bertin. 2001. Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. Mol. Microbiol. 40: 20-36.
- Hritz, M., E. Fisher, y D. R. Demuth. 1996. Differential regulation of the leukotoxin operon in highly leukotoxic and minimally leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect. Immun. 64: 2724-2729.
- Hsu, Y. M., N. Chin, C. F. Chang, e Y. F. Chang. 2003. Cloning and characterization of the *Actinobacillus pleuropneumoniae fur* gene and its role in regulation of ApxI and AfuABC expression. DNA Seq. 14: 169-181.
- Hughes, C., J. P. Issartel, K. Hardie, P. Stanley, E. Koronakis, y V. Koronakis. 1992a. Activation of *Escherichia coli* prohemolysin to the membrane targeted toxin by HlyC-directed ACP-dependent fatty acylation. FEMS Microbiol. Immunol. 105: 37-44.
- Hughes, C., P. Stanley, y V. Koronakis. 1992b. *Escherichia coli* hemolysin interactions with prokaryotic and eukaryotic cell membranes. Bioessays 14: 519-525.
- Huguet, T., C. Rosenberg, F. Casse-Delbart, P. de Lajudie, L. Jouanin, J. Batut, P. Boistard, J.-S. Julliot, y J. Denarie. 1983. Studies on *Rhizobium meliloti* plasmids and on their role in the control of nodule formation and nitrogen fixation: the pSym megaplasmids and the other large plasmids. En A. Puhler (ed.), Molecular genetics of the bacteria-plant interaction, pp. 35-45. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Hui, D., C. Morden, F. Zhang, y V. Ling. 2000. Combinatorial analysis of the structural requirements of the *Escherichia coli* hemolysin signal sequence. J. Biol. Chem. 275: 2713-2720.
- Hynes, M. F., y T. M. Finan. 1998. General Genetic Knowledge. En H. P. Spink, A. Kondorosi, y P. J. J. Hooykaas (eds.), The *Rhizobiaceae*: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria, pp. 25-43. Kluwer Academy Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Inoue, T., I. Tanimoto, T. Tada, T. Ohashi, K. Fukui, y H. Ohta. 2001. Fermentable-sugar-level-dependent regulation of leukotoxin synthesis in a variably toxic strain of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Microbiology 147: 2749-2756.
- Issartel, J. P., V. Koronakis, y C. Hughes. 1991. Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation. Nature 351: 759-761.
- Jack, R. W., J. R. Tagg, y B. Ray. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol. Rev. 59: 171-200.
- Jacob, F., L. Siminovitch, y E. Wollman. 1952. Sur la biosynthèse d'une colicine et sur son mode d'action. Ann. Inst. Pasteur 83: 295-315. (En Daw y Falkiner, 1996).

- James, R., C. Lazdunski, y F. Pattus. 1991. Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics. Springer-Verlag, New York, USA.
- Jarchau, T., T. Chakraborty, F. Garcia, y W. Goebel. 1994. Selection for transport competence of C-terminal polypeptides derived from *Escherichia coli* hemolysin: the shortest peptide capable of autonomous HlyB/HlyD-dependent secretion comprises the C-terminal 62 amino acids of HlyA. *Mol. Gen. Genet.* 245: 53-60.
- Jarma, E., G. Corradino, y L. B. Regassa. 2004. Anaerobiosis, growth phase and *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX toxin production. *Microb. Pathog.* 37: 29-33.
- Jarma, E., y L. B. Regassa. 2004. Growth phase mediated regulation of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxI and ApxII toxins. *Microbial pathogenesis* 36: 197-203.
- Jarvis, B. D. W., P. van Berkum, W. X. Chen, S. M. Nour, M. P. Fernandez, J. C. Cleyet-Marel, y M. Gillis. 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 895-898.
- Jáuregui, R., C. Abreu-Goodger, G. Moreno-Hagelsieb, J. Collado-Vides, y E. Merino. 2003. Conservation of DNA curvature signals in regulatory regions of prokaryotic genes. *Nucleic Acids Res.* 31: 6770-6777.
- Jeanmougin, F., J. D. Thompson, M. Gouy, D. G. Higgins, y T. J. Gibson. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.* 23: 403-405.
- Johnson, D. R., R. S. Bhatnagar, L. J. Knoll, y J. I. Gordon. 1994. Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 869-914.
- Johnston, A. W. B., J. L. Beynon, A. V. Buchanan-Wollaston, S. M. Setchell, P. R. Hirsch, y J. E. Beringer. 1978. High frequency transfer of nodulation ability between strains and species of *Rhizobium*. *Nature* 276: 635-636.
- Joint, I., K. Tait, M. E. Callow, J. A. Callow, D. Milton, P. Williams, y M. Camara. 2002. Cell-to-cell communication across the prokaryote-eukaryote boundary. *Science* 298: 1207-1207.
- Jordan, D. C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32: 136-139.
- Jordan, D. C. 1984. Gram-negative aerobic rods and cocci. Family III *Rhizobiaceae*. En N. Krieg, y J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, pp. 234-244. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA.
- Joseph, M. V., J. D. Desai, y A. J. Desai. 1983. Production of antimicrobial and bacteriocin-like substances by *Rhizobium trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 532-535.
- Joseph, M. V., J. D. Desai, y A. J. Desai. 1985. Possible involvement of phage-like structures in antagonism of cowpea rhizobia by *Rhizobium trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 459-461.
- Jubete, Y., J. C. Zabala, A. Juarez, y C. F. de la. 1995. *hlyM*, a transcriptional silencer downstream of the promoter in the *hly* operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177: 242-246.
- Kaiser, D. 1996. Bacteria also vote. *Science* 272: 1598-1599.
- Kaminski, P. A., J. Batut, y P. Boistard. 1998. A survey of symbiotic nitrogen fixation by rhizobia. En H. P. Spaink, A. Kondorosi, y P. J. J. Hooykaas (eds.), *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*, pp. 431-460. Kluwer Academy Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Kawula, T. H., y P. E. Orndorff. 1991. Rapid site-specific DNA inversion in *Escherichia coli* mutants lacking the histonelike protein H-NS. *J. Bacteriol.* 173: 4116-4123.
- Keane, W. F., R. Welch, G. Gekker, y P. K. Peterson. 1987. Mechanism of *Escherichia coli* α -hemolysin-induced injury to isolated renal tubular cells. *Am. J. Pathol.* 126: 350-7.
- Kelly, T. M., S. A. Stachula, C. R. H. Raetz, y M. S. Anderson. 1993. The *firA* gene of *Escherichia coli* encodes UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-glucosamine N-acyltransferase: the third step of endotoxin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 268: 19866-19874.
- Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70: 337-349.
- Knapp, S., J. Hacker, T. Jarchau, y W. Goebel. 1986. Large, unstable inserts in the chromosome affect virulence properties of uropathogenic *Escherichia coli* O6 strain 536. *J. Bacteriol.* 168: 22-30.
- Knösel, D. H. 1984. Genus *Phyllobacterium*. En N. R. Krieg, y J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, pp. 254-256. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA.

- Kobayashi, H., Y. Naciri-Graven, W. J. Broughton, y X. Perret. 2004. Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of *nod*-box controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234. *Mol. Microbiol.* 51: 335-347.
- Kolodrubetz, D., J. Spitznagel Jr., B. Wang, L. H. Phillips, C. Jacobs, y E. Kraig. 1996. *cis* elements and *trans* factors are both important in strain-specific regulation of the leukotoxin gene in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* 64: 3451-3460.
- Kolodrubetz, D., L. Phillips, C. Jacobs, A. Burgum, y E. Kraig. 2003. Anaerobic regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin transcription is ArcA/FnrA-independent and requires a novel promoter element. *Res. Microbiol.* 154: 645-653.
- Koronakis, E., C. Hughes, I. Milisav, y V. Koronakis. 1995. Protein exporter function and *in vitro* ATPase activity are correlated in ABC-domain mutants of HlyB. *Mol. Microbiol.* 16: 87-96.
- Koronakis, V., A. Sharff, E. Koronakis, B. Luisi, y C. Hughes. 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405: 914-919.
- Koronakis, V., E. Koronakis, y C. Hughes. 1989a. Isolation and analysis of the C-terminal signal directing export of *Escherichia coli* hemolysin protein across both bacterial membranes. *EMBO J.* 8: 595-605.
- Koronakis, V., M. Cross, B. Senior, E. Koronakis, y C. Hughes. 1987. The secreted hemolysins of *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, and *Morganella morganii* are genetically related to each other and to the α -hemolysin of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169: 1509-1515.
- Koronakis, V., M. Cross, y C. Hughes. 1988. Expression of the *E. coli* hemolysin secretion gene *hlyB* involves transcript antitermination within the *hly* operon. *Nucleic Acids Res.* 16: 4789-4799.
- Koronakis, V., M. Cross, y C. Hughes. 1989b. Transcription antitermination in an *Escherichia coli* haemolysin operon is directed progressively by *cis*-acting DNA sequences upstream of the promoter region. *Mol. Microbiol.* 3: 1397-1404.
- Koronakis, V., y C. Hughes. 1996. Synthesis, maturation and export of the *Escherichia coli* hemolysin. *Med. Microbiol. Immunol.* 185: 65-71.
- Kosslak, R. M., B. B. Bohlool, S. F. Dowdle, y M. J. Sadowsky. 1983. Competition of *Rhizobium japonicum* strains in early stages of soybean nodulation. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 870-873.
- Kosslak, R. M., y B. B. Bohlool. 1984. Suppression of nodule development of one side of a split-root system of soybeans caused by a prior inoculation of the other side. *Plant Physiol.* 75: 125-130.
- Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. II Roop, y K. M. Peterson. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBRR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175-176.
- Kraig, E., T. Dailey, y D. Kolodrubetz. 1990. Nucleotide sequence of the leukotoxin gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: homology to the alpha-hemolysin/leukotoxin gene family. *Infect. Immun.* 58: 920-929.
- Krin, E., O. Sismeiro, A. Danchin, y P. N. Bertin. 2002. The regulation of Enzyme IIA^{Glc} expression controls adenylate cyclase activity in *Escherichia coli*. *Microbiology* 148: 1553-1559.
- Kuhnert, P., B. Heyberger-Meyer, J. Nicolet, y J. Frey. 2000. Characterization of PaxA and its operon: a cohemolytic RTX toxin determinant from pathogenic *Pasteurella aerogenes*. *Infect. Immun.* 68: 6-12.
- Kumar, A., R. A. Malloch, N. Fujita, D. A. Smillie, A. Ishihama, y R. S. Hayward. 1993. The minus 35-recognition region of *Escherichia coli* sigma 70 is inessential for initiation of transcription at an "extended minus 10" promoter. *J. Mol. Biol.* 232: 406-418.
- Kuo, A., S. M. Callahan, y P. V. Dunlap. 1996. Modulation of luminescence operon expression by *N*-octanoyl-L-homoserine lactone in *ainS* mutants of *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* 178: 971-976.
- Kuykendall, L. D., B. Saxena, T. E. Devine, y S. E. Udell. 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 38: 501-505.
- Labandera, C. A., y J. M. Vincent. 1975. Competition between an introduced strain and native Uruguayan strains of *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil* 42: 327-347.
- Lacour, S., y P. Landini. 2004. SigmaS-dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of sigmaS-dependent genes and identification of their promoter sequences. *J. Bacteriol.* 186: 7186-7195.
- Lagares, A., G. Caetano-Anolles, K. Niehaus, J. Lorenzen, H. D. Ljunggren, A. Puhler, y G. Favelukes. 1992. A *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant altered in competitiveness for nodulation of alfalfa. *J. Bacteriol.* 174: 5941-5952.

- Lally, E. T., E. E. Golub, I. R. Kieba, N. S. Taichman, J. Rosenbloom, J. C. Rosenbloom, C. W. Gibson, y D. R. Demuth. 1989. Analysis of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin gene: delineation of unique features and comparison to homologous toxins. *J. Biol. Chem.* 274: 15451-15456.
- Lally, E. T., E. E. Golub, I. R. Kieba, N. S. Taichman, S. Decker, P. Berthold, C. W. Gibson, D. R. Demuth, y J. C. Rosenbloom. 1990. Structure and function of the *B* and *D* genes of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin complex. *Microb. Pathog.* 11: 111-121.
- Lally, E. T., R. B. Hill, I. R. Kieba, y J. Korostoff. 1999. The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol.* 7: 356-361.
- Lalonde, G., T. V. McDonald, P. Gardner, y P. D. O'Hanley. 1989. Identification of a hemolysin from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and characterization of its channel properties in planar phospholipid bilayers. *J. Biol. Chem.* 264: 13559-13564.
- Laurent-Winter, C., S. Ngo, A. Danchin, y P. Bertin. 1997. Role of *Escherichia coli* histone-like nucleotide-structuring protein in bacterial metabolism and stress response: identification of targets by two-dimensional electrophoresis. *Eur. J. Biochem.* 244: 767-773.
- Leeds, J. A., y R. A. Welch. 1996. RfaH enhances elongation of *Escherichia coli* *hlyCABD* mRNA. *J. Bacteriol.* 178: 1850-1857.
- Leeds, J. A., y R. A. Welch. 1997. Enhancing transcription through the *Escherichia coli* hemolysin operon, *hlyCABD*: RfaH and upstream JUMPstart DNA sequences function together via a postinitiation mechanism. *J. Bacteriol.* 179: 3519-3527.
- Letoffe, S., y C. Wandersman. 1992. Secretion of CyaA-PrtB and HlyA-PrtB fusion proteins in *Escherichia coli*: involvement of the glycine-rich repeat domain of *Erwinia chrysanthemi* protease B. *J. Bacteriol.* 174: 4920-4927.
- Lightner, V. A., R. M. Bell, y P. Modrich. 1983. The DNA sequences encoding *plsB* and *dgk* loci of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 258: 856-861.
- Lilie, H., W. Haehnel, R. Rudolph, y U. Baumann. 2000. Folding of a synthetic parallel beta-roll protein. *FEBS Lett.* 470: 173-177.
- Lim, K. B., C. R. Walker, L. Guo, S. Pellett, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, E. L. Hewlett, A. Ludwig, W. Goebel, R. A. Welch, y M. Hackett. 2000. *Escherichia coli* alpha-hemolysin (HlyA) is heterogeneously acylated in vivo with 14-, 15-, and 17-carbon fatty acids. *J. Biol. Chem.* 275: 36698-36702.
- Limpens, E., C. Franken, P. Smit, J. Willemse, T. Bisseling, y R. Geurts. 2003. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* 302: 630-633.
- Lin, W., K. J. Fullner, R. Clayton, J. A. Sexton, M. B. Rogers, K. E. Calia, S. B. Calderwood, C. Fraser, y J. J. Mekalanos. 1999. Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1071-1076.
- Lindström, K. 1989. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 365-367.
- Lithgow, J. K., A. Wilkinson, A. Hardman, B. Rodelas, F. Wisniewski-Dye, P. Williams, y J. A. Downie. 2000. The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Mol. Microbiol.* 37: 81-97.
- Lluch, C., y F. Ligeró. 1992. Bioquímica de la nitrogenasa. En J. González, y C. Lluch (eds.), *Interacción Planta-Microorganismo: Biología del Nitrógeno*, pp. 144-162. Editorial Rueda S. L., Madrid.
- Lo, R. Y., C. A. Strathdee, y P. E. Shewen. 1987. Nucleotide sequence of the leukotoxin genes of *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect. Immun.* 55: 1987-1996.
- Lotz, W., y F. Mayer. 1972. Isolation and characterization of a bacteriophage tail-like bacteriocin from a strain of *Rhizobium*. *J. Virol.* 9: 160-173.
- Ludwig, A., A. Schmid, R. Benz, y W. Goebel. 1991. Mutations affecting pore formation by haemolysin from *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 226: 198-208.
- Ludwig, A., y W. Goebel. 1999. The family of the multigenic encoded RTX toxin. En J. E. Alouf, y J. H. Freer (eds.), *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, pp. 330-348. Academic Press, London.
- Luo, Z. Q., T. E. Clemente, y S. K. Farrand. 2001. Construction of a derivative of *Agrobacterium tumefaciens* C58 that does not mutate to tetracycline resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14: 98-103.
- Lupas, A., M. Van Dyke, y J. Stock. 1991. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252: 1162-1164.
- Mackman, N., J. M. Nicaud, L. Gray, y I. B. Holland. 1986. Secretion of haemolysin by *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 125: 159-181.

- Madrid, C., J. M. Nieto, S. Paytubi, M. Falconi, C. O. Gualerzi, y A. Juárez. 2002a. Temperature- and H-NS-dependent regulation of a plasmid-encoded virulence operon expressing *Escherichia coli* hemolysin. *J. Bacteriol.* 184: 5058-5066.
- Madrid, C., J. M. Nieto, y A. Juárez. 2002b. Role of the Hha/YmoA family of proteins in the thermoregulation of the expression of virulence factors. *Int. J. Med. Microbiol.* 291: 425-432.
- Mahaffee, W. F., y J. W. Kloepper. 1997. Temporal Changes in the Bacterial Communities of Soil, Rhizosphere, and Endorhiza Associated with Field-Grown Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Microb. Ecol.* 34: 210-223.
- Mahillon, J., y M. Chandler. 1998. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 725-774.
- Malott, R. J., y R. Y. C. Lo. 2002. Studies on the production of quorum-sensing signal molecules in *Mannheimia haemolytica* A1 and other *Pasteurellaceae* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 206: 25-30.
- Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, C. DeWeese-Scott, N. D. Fedorova, L. Y. Geer, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, A. R. Jacobs, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, T. Madej, G. H. Marchler, R. Mazumder, A. N. Nikolskaya, A. R. Panchenko, B. S. Rao, B. A. Shoemaker, V. Simonyan, J. S. Song, P. A. Thiessen, S. Vasudevan, Y. Wang, R. A. Yamashita, J. J. Yin, y S. H. Bryant. 2003. CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments. *Nucleic Acids Res.* 31: 383-387.
- Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, C. DeWeese-Scott, N. D. Fedorova, L. Y. Geer, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, A. R. Jacobs, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, T. Madej, G. H. Marchler, R. Mazumder, A. N. Nikolskaya, A. R. Panchenko, B. S. Rao, B. A. Shoemaker, V. Simonyan, J. S. Song, P. A. Thiessen, S. Vasudevan, Y. Wang, R. A. Yamashita, J. J. Yin, y S. H. Bryant. 2003. CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments. *Nucleic Acids Res.* 31: 383-387.
- Marciel, A. M., y S. K. Highlander. 2001. Use of operon fusions in *Mannheimia haemolytica* to identify environmental and *cis*-acting regulators of leukotoxin transcription. *Infect. Immun.* 69: 6231-6239.
- Marketon, M. M., M. R. Gronquist, A. Eberhard, y J. E. Gonzalez. 2002. Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* *sinR/sinI* locus and the production of novel *N*-acyl homoserine lactones. *J. Bacteriol.* 184: 5686-5695.
- Marketon, M. M., S. A. Glenn, A. Eberhard, y J. E. Gonzalez. 2003. Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 185: 325-331.
- Marketon, M. M., y J. E. Gonzalez. 2002. Identification of two quorum-sensing systems in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 184: 3466-3475.
- Martin, P. G., P. Lachance, y D. F. Niven. 1985. Production of RNA-dependent haemolysin by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can. J. Microbiol.* 31: 456-462.
- Martínez-Romero, E., L. Segovia, F. M. Mercante, A. A. Franco, P. Graham, y M. A. Pardo. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 417-426.
- Mathesius, U., S. Mulders, M. Gao, M. Teplitski, G. Caetano-Anolles, B. G. Rolfe, y W. D. Bauer. 2003. Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 1444-1449.
- Maudsley, J. R., y S. Kadis. 1986. Growth and hemolysin production by *H. pleuropneumoniae* cultivated in a chemically defined medium. *Can. J. Microbiol.* 32: 801-805.
- McClean, K. H., M. K. Winson, L. Fish, A. Taylor, S. R. Chhabra, M. Camara, M. Daykin, J. H. Lamb, S. Swift, B. W. Bycroft, G. S. Stewart, y P. Williams. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143: 3703-3711.
- McDermott, T. R., y P. H. Graham. 1990. Competitive ability and efficiency in nodule formation of strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3035-3039.
- Mekalanos, J. J. 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* 174: 1-7.
- Mellor, H. Y., A. R. Glenn, R. Arwas, y M. J. Dilworth. 1987. Symbiotic and competitive properties of motility mutants of *Rhizobium trifolii* TA1. *Arch. Microbiol.* 148: 34-39.
- Mergaert, J., M. C. Cnockaert, y J. Swings. 2002. *Phyllobacterium myrsinacearum* (subjective synonym *Phyllobacterium rubiacearum*) emend. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1821-1823.
- Michiels, J., C. Xi, J. Verhaert, y J. Vanderleyden. 2002. The functions of Ca(2+) in bacteria: a role for EF-hand proteins? *Trends Microbiol.* 10: 87-93.

- Mikulskis, A. V., y G. R. Cornelis. 1994. A new class of proteins regulating gene expression in enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 11: 77-86.
- Miller, J. H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*, pp. 352-355. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Mitaku, S., T. Hirokawa, y T. Tsuji. 2002. Amphiphilicity index of polar amino acids as an aid in the characterization of amino acid preference at membrane-water interfaces. *Bioinformatics* 18: 608-616.
- Mitaku, S., y T. Hirokawa. 1999. Physicochemical factors for discriminating between soluble and membrane proteins: hydrophobicity of helical segments and protein length. *Protein Eng.* 12: 953-957.
- Mitchell, C., L. Gao, y D. R. Demuth. 2003. Positive and negative *cis*-acting regulatory sequences control expression of leukotoxin in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 652. *Infect. Immun.* 71: 5640-5649.
- Mitchell, J. E., D. Zheng, S. J. W. Busby, y S. D. Minchin. 2003. Identification and analysis of 'extended -10' promoters in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 31: 4689-4695.
- Moreira, L. M., J. D. Becker, A. Puhler, y A. Becker. 2000. The *Sinorhizobium meliloti* ExpE1 protein secreted by a type I secretion system involving ExpD1 and ExpD2 is required for biosynthesis or secretion of the exopolysaccharide galactoglucan. *Microbiology* 146: 2237-2248.
- Mouriño, M., C. Madrid, C. Balsalobre, A. Prenafeta, F. J. Muñoa, J. Blanco, M. Blanco, J. E. Blanco, y A. Juárez. 1996. The Hha protein as a modulator of expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 64: 2881-2884.
- Mouriño, M., F. J. Muñoa, C. Balsalobre, P. Díaz, C. Madrid, y A. Juárez. 1994. Environmental regulation of α -hemolysin expression in *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.* 16: 249-259.
- Muffler, A., D. Fischer, y R. Hengge-Aronis. 1996. The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Q_B RNA replication, is essential for *rpoS* translation in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 10: 1143-1151.
- Munteanu, M. G., K. Vlahovick, S. Parthasarathy, I. Simon, y S. Pongor. 1998. Rod models of DNA: sequence-dependent anisotropic elastic modelling of local bending phenomena. *Trends Biochem. Sci.* 23: 341-347.
- Nakai, K., y M. Kanehisa. 1991. Expert system for predicting protein localization sites in Gram-negative bacteria. *Proteins* 11: 95-110.
- Narayanan, S. K., T. G. Nagaraja, M. M. Chengappa, y G. C. Stewart. 2002. Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Veterinary Microbiology* 84: 337-356.
- Newton, J. A., y R. G. Fray. 2004. Integration of environmental and host-derived signals with quorum sensing during plant-microbe interactions. *Cell. Microbiol.* 6: 213-224.
- Nicaud, J. M., N. Mackman, L. Gray, e I. B. Holland. 1985. Characterisation of HlyC and mechanism of activation and secretion of haemolysin from *E. coli* 2001. *FEBS Lett.* 187: 339-344.
- Nicholas, K. B., H. B. Nicholas Jr., y D. W. Deerfield II. 1997. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *Embnet.news* 4: 1-4.
- Nicolet, J. 1992. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. En A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. D'Allaire, y D. J. Taylor (eds.), *Diseases of swine*, 7^a ed., pp. 401-408. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Niebel, A., J. J. Bono, R. Ranjeva, y J. V. Cullimore. 1997. Identification of a high affinity binding site for lipo-oligosaccharidic NodRm factors in the microsomal fraction of *Medicago* cell suspension cultures. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10: 132-134.
- Nieto, J. M., C. Madrid, A. Prenafeta, E. Miquelay, C. Balsalobre, M. Carrascal, y A. Juárez. 2000. Expression of the hemolysin operon in *Escherichia coli* is modulated by a nucleoid-protein complex that includes the proteins Hha and H-NS. *Mol. Gen. Genet.* 263: 349-358.
- Nieto, J. M., C. Madrid, E. Miquelay, J. L. Parra, S. Rodriguez, y A. Juarez. 2002. Evidence for direct protein-protein interaction between members of the enterobacterial Hha/YmoA and H-NS families of proteins. *J. Bacteriol.* 184: 629-635.
- Nieto, J. M., M. Carmona, S. Bolland, Y. Jubete, F. de la Cruz, y A. Juárez. 1991. The *hha* gene modulates haemolysin expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5: 1285-1293.
- Nieto, J. M., M. J. A. Bailey, C. Hughes, y V. Koronakis. 1996. Suppression of transcription polarity in the *Escherichia coli* hemolysin operon by a short upstream element shared by polysaccharide and DNA transfer determinants. *Mol. Microbiol.* 19: 705-713.
- Nogueira, T., y M. Springer. 2000. Post-transcriptional control by global regulators of gene expression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 154-158.

- Nour, S. M., J. C. Cleyet-Marel, P. Normand, y M. P. Fernandez. 1995. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 640-648.
- Nour, S. M., M. P. Fernandez, P. Normand, y J. C. Cleyet-Marel. 1994. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 511-522.
- Nutman, P. S. 1987. Centenary lecture. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 317: 69-106.
- Ochman, H., A. S. Gerber, y D. L. Hartl. 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*.120: 621-623.
- O'Gara, J. P., y C. J. Dorman. 2000. Effects of local transcription and H-NS on inversion of the *fim* switch of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 36: 457-466.
- Oliveira, L. A., y P. H. Graham. 1989. Speed of nodulation and competitive ability among strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Arch. Microbiol.* 153: 311-315.
- Omori, K., y A. Idei. 2003. Gram-negative bacterial ATP-binding cassette protein exporter family and diverse secretory proteins. *J. Biosci. Bioeng.* 95: 1-12.
- Ophel, K., y A. Kerr. 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 236-241.
- Oresnik, I. J., S. Twelker, y M. F. Hynes. 1999. Cloning and characterization of a *Rhizobium leguminosarum* gene encoding a bacteriocin with similarities to RTX toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2833-2840.
- Oropeza-Wekerle, R. L., S. Muller, J. P. Briand, R. Benz, A. Schmid, y W. Goebel. 1992. Haemolysin-derived synthetic peptides with pore-forming and haemolytic activity. *Mol. Microbiol.* 6: 115-121.
- Osička, R., K. Procházková, M. Šulc, I. Linhartová, V. Havlíček, y P. Šebo. 2004. A novel "clip-and-link" activity of repeat in toxin (RTX) proteins from gram-negative pathogens. Covalent protein cross-linking by an Asp-Lys isopeptide bond upon calcium-dependent processing at an Asp-Pro bond. *J. Biol. Chem.* 279: 24944-24956.
- Ovtsyna, A. O., G. J. Rademaker, E. Esser, J. Weinmann, B. J. Rolfe, I. A. Tikhonovich, B. J. J. Lugtenberg, J. E. Thomas-Oates, y H. P. Spaik. 1999. Comparison of characteristics of the *nodX* genes from various *Rhizobium leguminosarum* strains. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12: 252-258.
- Parniske, M., y J. A. Downie. 2003. Plant biology: locks, keys and symbioses. *Nature* 425: 569-570.
- Paulsen, I. T., J. H. Park, P. S. Choi, y M. H. Saier Jr. 1997. A family of Gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 156: 1-8.
- Pellett, S., y R. A. Welch. 1996. *Escherichia coli* hemolysin mutants with altered target cell specificity. *Infect. Immun.* 64: 3081-3087.
- Perret, X., C. Staehelin, y W. J. Broughton. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 180-201.
- Phillips, D. A., C. M. Joseph, y C. A. Maxwell. 1992. Trigonelline and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 99: 1526-1531.
- Pierce, M., y W. D. Bauer. 1983. A rapid regulatory response governing nodulation in soybean. *Plant Physiol.* 73: 286-290.
- Pinton, R., Z. Varanini, y P. Nannipieri. 2001. The rizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants, and microorganisms. En R. Pinton, Z. Varanini, y P. Nannipieri (eds.), *The rizosphere*, pp. 1-18. Mercel Dekker, Inc, New York, USA.
- Plazinski, J., P. J. Dart, y B. G. Rolfe. 1983. Plasmid visualization and *nif* gene location in nitrogen-fixing *Azospirillum* strains. *J. Bacteriol.* 155: 1429-1433.
- Poulsen, K., O. K. Ennibi, y D. Haubek. 2003. Improved PCR for detection of the highly leukotoxic JP2 clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque samples. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4829-4832.
- Pozo, C., B. Rodelas, S. de la Escalera, y J. González-López. 2002. D,L-Hydantoinase activity of an *Ochrobactrum anthropi* strain. *J. Appl. Microbiol.* 92: 1028-1034.
- Radutoiu, S., L. H. Madsen, E. B. Madsen, H. H. Felle, Y. Umehara, M. Gronlund, S. Sato, Y. Nakamura, S. Tabata, N. Sandal, y J. Stougaard. 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425: 585-592.
- Raloff, J. 1998. Staging germ warfare in foods. *Sci. News* 153: 89-90.
- Redfield, R. J. 2002. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiol.* 10: 365-370.
- Reese, M. G. 2001. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput. Chem.* 26: 51-56.

- Reeves, P. 1979. The concept of bacteriocins. Zentralbl. Bakteriologie. [Orig. A] 244: 78-89.
- Rice, P., I. Longden, y A. Bleasby. 2000. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. Trends Genet. 16: 276-277.
- Riely, B. K., J. M. Ane, R. V. Penmetsa, y D. R. Cook. 2004. Genetic and genomic analysis in model legumes bring Nod-factor signaling to center stage. Curr. Opin. Plant Biol. 7: 408-413.
- Riker, A. J., W. M. Banfield, W. H. Wright, G. W. Keitt, y H. E. Sagen. 1930. Studies on infectious hairy-root of nursery apple trees. J. Agric. Res. 41: 507-540.
- Riley, M. A., y D. M. Gordon. 1992. A survey of Col plasmids in natural isolates of *Escherichia coli* and an investigation into the stability of Col-plasmid lineages. J. Gen. Microbiol. 138: 1345-1352.
- Riley, M. A., y J. E. Wertz. 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. Annu. Rev. Microbiol. 56: 117-137.
- Rimsky, S. 2004. Structure of the histone-like protein H-NS and its role in regulation and genome superstructure. Curr. Opin. Microbiol. 7: 109-114.
- Rivas, R., A. Willems, J. L. Palomo, P. Garcia-Benavides, P. F. Mateos, E. Martinez-Molina, M. Gillis, y E. Velazquez. 2004. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1271-1275.
- Robledo, E. A., A. J. Scupham, y E. W. Triplett. 1997. Trifolitoxin production in *Rhizobium etli* strain CE3 increases competitiveness for rhizosphere colonization and root nodulation of *Phaseolus vulgaris* in soil. Mol. Plant Microbe Interact. 10: 228-233.
- Robledo, E. A., K. Kmiecik, E. S. Oplinger, J. Nienhuis, y E. W. Triplett. 1998. Trifolitoxin production increases nodulation competitiveness of *Rhizobium etli* CE3 under agricultural conditions. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2630-2633.
- Rock, C. O., y S. Jackowski. 1982. Regulation of phospholipid synthesis in *Escherichia coli*: composition of the acyl-acyl carrier protein pool in vivo. J. Biol. Chem. 257: 759-765.
- Rodelas, B. 1995. Interacción *Rhizobium/Azospirillum* y *Rhizobium/Azotobacter*. Efecto sobre la nodulación y fijación simbiótica de N₂ en *Vicia faba* L. Tesis Doctoral, Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada.
- Rodelas, B., J. González-López, V. Salmerón, M. V. Martínez-Toledo, y C. Pozo. 1998. Symbiotic effectiveness and bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolated from agricultural soils in Spain. Appl. Soil Ecol. 8: 51-60.
- Rodelas, B., J. K. Lithgow, F. Wisniewski-Dye, A. Hardman, A. Wilkinson, A. Economou, P. Williams, y J. A. Downie. 1999. Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere-expressed (*rhi*) genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. J. Bacteriol. 181: 3816-3823.
- Rodelas, B., L. Mora, C. Pozo, M. V. Martínez-Toledo, y J. González-López. 2002. Molecular basis of bacteriocin production by *Rhizobium*. Recent Res. Devel. Mol. Microbiol. 1: 19-31.
- Rome, S., M. P. Fernandez, B. Brunel, P. Normand, y J. C. Cleyet-Marel. 1996. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 972-980.
- Roslycky, E. B. 1967. Bacteriocin production in the rhizobia bacteria. Can. J. Microbiol. 13: 431-432.
- Ross, W., K. K. Gosink, J. Salomon, K. Igarashi, C. Zou, A. Ishihama, K. Severinov, y R. L. Gourse. 1993. A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. Science 262: 1407-1413.
- Rowe, G. E., S. Pellett, y R. A. Welch. 1994. Analysis of toxinogenic functions associated with the RTX repeat region and monoclonal antibody D12 epitope of *Escherichia coli* hemolysin. Infect. Immun. 62: 579-588.
- Sadowsky, M. J., y P. H. Graham. 1998. Soil biology of the *Rhizobiaceae*. En H. P. Spaink, A. Kondorosi, y P. J. J. Hooykaas (eds.), The *Rhizobiaceae*: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria, pp. 155-172. Kluwer Academy Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook, J., y D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanjuan, J. y J. Olivares. 1989. Implication of *nifA* in regulation of genes located on a *Rhizobium meliloti* cryptic plasmid that affect nodulation efficiency. J. Bacteriol. 171: 4154-4161.
- Sanjuan, J., y J. Olivares. 1991. NifA-NtrA regulatory system activates transcription of *nfe*, a gene locus involved in nodulation competitiveness of *Rhizobium meliloti*. Arch. Microbiol. 155: 543-548.

- Sargent, L., S. Z. Huang, B. G. Rolfe, y M. A. Djordjevic. 1987. Split-root assays using *Trifolium subterraneum* show that *Rhizobium* infection induces a systemic response that can inhibit nodulation of another invasive *Rhizobium* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1611-1619.
- Saurin, W., M. Hofnung, y E. Dassa. 1999. Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J. Mol. Evol.* 48: 22-41.
- Schaefer, A. L., D. L. Val, B. L. Hanzelka, J. E. Cronan, Jr., y E. P. Greenberg. 1996. Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 9505-9509.
- Schäfer, A., A. Tauch, W. Jäger, J. Kalinowski, G. Thierbach, y A. Pühler. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145: 69-73.
- Schaller, A., R. Kuhn, P. Kuhnert, J. Nicolet, T. J. Anderson, J. I. MacInnes, R. P. Segers, y J. Frey. 1999. Characterization of *apxIVA*, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* 145: 2105-2116.
- Schlaman, H. R. M., D. A. Phillips, y E. Kondorosi. 1998. Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. En H. P. Spaink, A. Kondorosi, y P. J. J. Hooykaas (eds.), *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*, pp. 361-386. Kluwer Academy Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Schmidt, H., y M. Hensel. 2004. Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 14-56.
- Scholla, M. H., y G. H. Elkan. 1984. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 484-486.
- Schripsema, J., K. E. E. de Ruder, T. B. van Vliet, P. P. Lankhorst, E. de Vroom, J. W. Kijne, y A. A. N. van Brussel. 1996. Bacteriocin *small* of *Rhizobium leguminosarum* belongs to the class of *N*-acyl-L-homoserine lactone molecules, known as autoinducers and as quorum sensing co-transcription factors. *J. Bacteriol.* 178: 366-371.
- Schröder, O., y R. Wagner. 2000. The bacterial DNA-binding protein H-NS represses ribosomal RNA transcription by trapping RNA polymerase in the initiation complex. *J. Mol. Biol.* 298: 737-748.
- Schröder, O., y R. Wagner. 2002. The bacterial regulatory protein H-NS--a versatile modulator of nucleic acid structures. *Biol. Chem.* 383: 945-960.
- Schroeter, J. 1886. En F. Cohn (ed.), *Kryptogamenflora von Schlesien, Band 3, Heft 3, Pilze*, pp. 1-814. J. U. Kern's Verlag, Breslau.
- Schüleín, R., I. Gentshev, H. J. Mollenkopf, y W. Goebel. 1992. A topological model for the haemolysin translocator protein HlyD. *Mol. Gen. Genet.* 234: 155-163.
- Schweizer, H. D. 1993. Small broad-host-range gentamycin resistance gene cassettes for site-specific insertion and deletion mutagenesis. *BioTechniques* 15: 831-834.
- Schwinghamer, E. A. 1971. Antagonism between strains of *Rhizobium trifolii* in culture. *Soil Biol. Biochem.* 3: 355-363.
- Schwinghamer, E. A. 1975. Properties of some bacteriocins produced by *Rhizobium trifolii*. *J. Gen. Microbiol.* 91: 403-413.
- Schwinghamer, E. A., C. E. Pankhurst, y P. R. Whitfield. 1973. A phage-like bacteriocin of *Rhizobium trifolii*. *Can. J. Microbiol.* 19: 359-368.
- Schwinghamer, E. A., y J. Brockwell. 1978. Competitive advantage of bacteriocin and phage-producing strains of *Rhizobium trifolii* in mixed culture. *Soil Biol. Biochem.* 10: 383-387.
- Schwinghamer, E. A., y R. P. Belkengren. 1968. Inhibition of rhizobia by a strain of *Rhizobium trifolii*: some properties of the antibiotic and of the strain. *Arch. Mikrobiol.* 64: 130-145.
- Scupham, A. J., Y. Dong, y E. W. Triplett. 2002. Role of *txfE*, but not *txfG*, in trifolotoxin resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4334-4340.
- Segovia, L., J. P. W. Young, y E. Martínez-Romero. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 374-377.
- Shaw, P. D., G. Ping, S. L. Daly, C. Cha, J. E. Cronan Jr., K. L. Rinehart, y S. K. Farrand. 1997. Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6036-6041.
- Sheehan, B. J., J. T. Bosse, A. J. Beddek, A. N. Rycroft, J. S. Kroll, y P. R. Langford. 2003. Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* genes important for survival during infection in its natural host. *Infect. Immun.* 71: 3960-3970.

- Shewen, P. E., y B. N. Wilkie. 1982. Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes. *Infect. Immun.* 35: 91-94.
- Short, E. C. Jr., y H. J. Kurtz. 1971. Properties of the hemolytic activities of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 3: 678-687.
- Simon, R., U. Priefer, y A. Pühler. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Biotechnology* 1: 784-791.
- Skerman, V. B. D., V. McGowan, y P. H. A. Sneath. 1980. Approved Lists of Bacterial Names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30: 225-420.
- Slots, J., H. S. Reynolds, y R. J. Genco. 1980. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infect. Immun.* 29: 1013-1020.
- Smith, E. F., y C. O. Townsend. 1907. A plant-tumor of bacterial origin. *Science (Washington)* 25: 671-673.
- Soloaga, A., M. P. Veiga, L. M. Garcia-Segura, H. Ostolaza, R. Brasseur, y F. M. Goni. 1999. Insertion of *Escherichia coli* alpha-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol. Microbiol.* 31: 1013-1024.
- Sonden, B., y B. E. Uhlin. 1996. Coordinated and differential expression of histone-like proteins in *Escherichia coli*: regulation and function of the H-NS analog StpA. *EMBO J.* 15: 4970-4980.
- Soto, M. J., A. Zorzano, J. Mercado-Blanco, V. Lepek, J. Olivares, y N. Toro. 1993. Nucleotide sequence and characterization of *Rhizobium meliloti* nodulation competitiveness genes *nfe*. *J. Mol. Biol.* 229: 570-576.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific genes among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Spaink, H. P., J. H. Okker, C. A. Wijffelman, E. Pees, y B. J. J. Lugtenberg. 1987. Promoters in the nodulation region of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol. Biol.* 9: 27-39.
- Spitznagel, J. J., E. Kraig, y D. Kolodrubetz. 1995. The regulation of leukotoxin production in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain JP2. *Adv. Dent. Res.* 9: 48-54.
- Spitznagel, J., Jr., E. Kraig, y D. Kolodrubetz. 1991. Regulation of leukotoxin in leukotoxic and nonleukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* 59: 1394-1401.
- Spurio, R., M. Falconi, A. Brandi, C. L. Pon, y C. O. Gualerzi. 1997. The oligomeric structure of nucleoid protein H-NS is necessary for recognition of intrinsically curved DNA and for bending. *EMBO J.* 16: 1795-1805.
- Squartini, A., P. Struffi, H. Döring, S. Selenska-Pobell, E. Tola, A. Giacomini, E. Vendramin, E. Velázquez, P. F. Mateos, E. Martínez-Molina, F. B. Dazzo, S. Casella, y M. P. Nuti. 2002. *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly '*Rhizobium hedysari*'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1267-1276.
- Stanley, P., L. C. Packman, V. Koronakis, y C. Hughes. 1994. Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of *Escherichia coli* hemolysin. *Science* 266: 1992-1996.
- Stanley, P., V. Koronakis, K. Hardie, y C. Hughes. 1996. Independent interaction of the acyltransferase HlyC with two maturation domains of the *Escherichia coli* toxin HlyA. *Mol. Microbiol.* 20: 813-822.
- Stanley, P., V. Koronakis, y C. Hughes. 1991. Mutational analysis supports a role for multiple structural features in the C-terminal secretion signal of *Escherichia coli* haemolysin. *Mol. Microbiol.* 5: 2391-2403.
- Stanley, P., V. Koronakis, y C. Hughes. 1998. Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 309-333.
- Stephens, P. M., y J. E. Cooper. 1988. Variation in speed of infection of "no root hair zone" of white clover and nodulating competitiveness among strains of *Rhizobium trifolii*. *Soil Biol. Biochem.* 20: 465-470.
- Stevens, M. P., B. R. Clarke, e I. S. Roberts. 1997. Regulation of the *Escherichia coli* K5 capsule gene cluster by transcription antitermination. *Mol. Microbiol.* 24: 1001-1012.
- Stracke, S., C. Kistner, S. Yoshida, L. Mulder, S. Sato, T. Kaneko, S. Tabata, N. Sandal, J. Stougaard, K. Szczyglowski, y M. Parniske. 2002. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417: 959-962.
- Strathdee, C. A., y R. Y. C. Lo. 1989. Regulation of expression of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin determinant. *J. Bacteriol.* 171: 5955-5962.
- Sullivan, J. T., y C. W. Ronson. 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5145-5149.
- Sutton, J. M., E. J. Lea, y J. A. Downie. 1994. The nodulation-signaling protein NodO from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* forms ion channels in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9990-9994.

- Sutton, J. M., J. Peart, G. Dean, y J. A. Downie. 1996. Analysis of the C-terminal secretion signal of the *Rhizobium leguminosarum* nodulation protein NodO: a potential system for the secretion of heterologous proteins during nodule invasion. *Mol. Plant Microbe Interact.* 9: 671-680.
- Suttorp, N., B. Floer, H. Schnittler, W. Seeger, y S. Bhakdi. 1990. Effects of *Escherichia coli* hemolysin on endothelial cell function. *Infect. Immun.* 58: 3796-3801.
- Tagg, J. R., A. S. Dajani, y L. W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40: 722-756.
- Taichman, N. S., D. L. Simpson, S. Sakurada, M. Cranfield, J. DiRienzo, y J. Slots. 1987. Comparative studies on the biology of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin in primates. *Oral Microbiol. Immunol.* 2: 97-104.
- Tan, Z. Y., F. L. Kan, G. X. Peng, E. T. Wang, B. Reinhold-Hurek, y W. X. Chen. 2001. *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 909-914.
- Tavakoli, N., A. Comanducci, H. M. Dodd, M. C. Lett, B. Albiger, y P. Bennett. 2000. IS1294, a DNA element that transposes by RC transposition. *Plasmid* 44: 66-84.
- Telford, G., D. Wheeler, P. Williams, P. T. Tomkins, P. Appleby, H. Sewell, G. S. Stewart, B. W. Bycroft, y D. I. Pritchard. 1998. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect. Immun.* 66: 36-42.
- Tendeng, C., y P. N. Bertin. 2003. H-NS in Gram-negative bacteria: a family of multifaceted proteins. *Trends Microbiol.* 11: 511-518.
- Teplitski, M., J. B. Robinson, y W. D. Bauer. 2000. Plants secrete substances that mimic bacterial *N*-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13: 637-648.
- Thanabalu, T., E. Koronakis, C. Hughes, y V. Koronakis. 1998. Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E. coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *EMBO J.* 17: 6487-6496.
- Thompson, S. A., L. L. Wang, A. West, y P. F. Sparling. 1993a. *Neisseria meningitidis* produces iron-regulated proteins related to the RTX family of exoproteins. *J. Bacteriol.* 175: 811-818.
- Thompson, S. A., L. L. Wang, y P. F. Sparling. 1993b. Cloning and nucleotide sequence of *frpC*, a second gene from *Neisseria meningitidis* encoding a protein similar to RTX cytotoxins. *Mol. Microbiol.* 9: 85-96.
- Thorne, S. H., y H. D. Williams. 1999. Cell density-dependent starvation survival of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*: identification of the role of an *N*-acyl homoserine lactone in adaptation to stationary-phase survival. *J. Bacteriol.* 181: 981-990.
- Tippner, D., y R. Wagner. 1995. Fluorescence analysis of the *Escherichia coli* transcription regulator H-NS reveals two distinguishable complexes dependent on binding to specific or non-specific DNA sites. *J. Biol. Chem.* 270: 22243-22247.
- Toledo, I., L. Lloret, y E. Martínez-Romero. 2003. *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 54-64.
- Trinick, M. J., y P. A. Hadobas. 1989. Competition by *Bradyrhizobium* strains for nodulation of the nonlegume *Parasponia andersonii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1242-1248.
- Triplett, E. W. 1988. Isolation of genes involved in nodulation competitiveness from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* T24. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3810-3814.
- Triplett, E. W. 1990. Construction of a symbiotically effective strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with increased nodulation competitiveness. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 98-103.
- Triplett, E. W., B. T. Breil, y G. A. Splitter. 1994. Expression of *txf* and sensitivity to the rhizobial peptide antibiotic trifolixin in a taxonomically distinct group of alpha-proteobacteria including the animal pathogen *Brucella abortus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4163-4166.
- Triplett, E. W., y M. J. Sadowsky. 1992. Genetics of competition for nodulation of legumes. *Ann. Rev. Microbiol.* 46: 399-428.
- Triplett, E. W., y R. D. Vogelzang. 1989. A rapid bioassay for the quantitative measurement of the activity of trifolixin, an anti-rhizobial peptide. *J. Microbiol. Methods* 10: 177-182.
- Triplett, E. W., y T. M. Barta. 1987. Trifolixin production and nodulation are necessary for the expression of superior nodulation competitiveness by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain T24 on clover. *Plant Physiol.* 85: 335-342.
- Twelker, S., I. J. Oresnik, y M. F. Hynes. 1999. Molecular analysis of bacteriocin encoding loci from *Rhizobium leguminosarum*. En E. Martínez, y G. Hernández (eds.), *Highlights in Nitrogen Fixation Research*, pp. 105-108. Kluwer Academic Plenum Publishers, New York.

- Ueguchi, C., M. Kakeda, y T. Mizuno. 1993. Autoregulatory expression of the *Escherichia coli hns* gene encoding a nucleoid protein: H-NS functions as a repressor of its own transcription. *Mol. Gen. Genet.* 236: 171-178.
- Ussery, D. W., J. C. D. Hinton, B. J. A. M. Jordi, P. E. Granum, A. Seirafi, R. J. Stephen, A. E. Tupper, G. Berridge, J. M. Sidebotham, y C. F. Higgins. 1994. The chromatin-associated protein H-NS. *Biochimie* 76: 968-980.
- Validation List N° 15. 1984. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 355-357.
- van Berkum, P., D. Beyene, G. Bao, T. A. Campbell, y B. D. Eardly. 1998. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 13-22.
- van Berkum, P., y B. D. Eardly. 1998. Molecular evolutionary systematics of the *Rhizobiaceae*. En H. P. Spaink, A. Kondorosi, y P. J. J. Hooykaas (eds.), *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*, pp. 1-24. Kluwer Academy Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- van Brussel, A. N. N., S. A. J. Zaat, C. A. Wijffelman, E. Pees, y B. J. J. Lugtenberg. 1985. Bacteriocin *small* of fast-growing rhizobia is chloroform soluble and is not required for effective nodulation. *J. Bacteriol.* 162: 1079-1082.
- van Rensburg, J., y B. W. Strijdom. 1982. Root surface association in relation to nodulation of *Medicago sativa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 93-97.
- Velázquez, E., J. M. Igual, A. Willems, M. P. Fernández, E. Muñoz, P. F. Mateos, A. Abril, N. Toro, P. Normand, E. Cervantes, M. Gillis, y E. Martínez-Molina. 2001. *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1011-1021.
- Venter, A. P., S. Twelker, I. J. Oresnik, y M. F. Hynes. 2001. Analysis of the genetic region encoding a novel rhizobiocin from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain 306. *Can. J. Microbiol.* 47: 495-502.
- Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Vlassak, K. M., E. Luyten, C. Verreth, P. van Rhijn, T. Bisseling, y J. Vanderleyden. 1998. The *Rhizobium* sp. BR816 *nodO* gene can function as a determinant for nodulation of *Leucaena leucocephala*, *Phaseolus vulgaris*, and *Trifolium repens* by a diversity of *Rhizobium* spp. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11: 383-392.
- Vogel, M., J. Hess, I. Then, A. Juarez, y W. Goebel. 1988. Characterization of a sequence (*hlyR*) which enhances synthesis and secretion of hemolysin in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 212: 76-84.
- von Bodman, S. B., D. R. Majerczak, y D. L. Coplin. 1998. A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7687-7692.
- Waldsich, C., R. Grossberger, y R. Schroeder. 2002. RNA chaperone StpA loosens interactions of the tertiary structure in the *td* group I intron in vivo. *Genes Dev.* 16: 2300-2312.
- Walker, S. A., y J. A. Downie. 2000. Entry of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* into root hairs requires minimal Nod factor specificity, but subsequent infection thread growth requires *nodO* or *nodE*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13: 754-762.
- Wandersman, C., y P. Delepelaire. 1990. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4776-4780.
- Wang, E. T., P. van Berkum, D. Beyene, X. H. Sui, O. Dorado, W. X. Chen, y E. Martínez-Romero. 1998. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 687-699.
- Wang, E. T., P. van Berkum, X. H. Sui, D. Beyene, W. X. Chen, y E. Martínez-Romero. 1999. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 51-65.
- Watson, W. T., T. D. Minogue, D. L. Val, S. B. von Bodman, y M. E. Churchill. 2002. Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Mol. Cell* 9: 685-694.
- Wei, G. H., E. T. Wang, Z. Y. Tan, M. E. Zhu, y W. X. Chen. 2002. *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 2231-2239.
- Wei, G. H., Z. Y. Tan, M. E. Zhu, E. T. Wang, S. Z. Han, y W. X. Chen. 2003. Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1575-1583.

- Welch, R. A. 1987. Identification of two different hemolysin determinants in uropathogenic *Proteus* isolates. *Infect. Immun.* 55: 2183-2190.
- Welch, R. A. 1995. Phylogenetic analyses of the RTX toxin family. En J. A. Roth, C. A. Bolin, K. A. Brogden, F. C. Minion, y M. J. Wannemuehler (eds.), *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*, 2^a ed., pp. 195-206. ASM Press, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Welch, R. A. 2001. RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 257: 85-111.
- Welch, R. A., E. P. Dellinger, B. Minshew, y S. Falkow. 1981. Hemolysin contributes to virulence of extraintestinal *Escherichia coli* infections. *Nature* 294: 665-667.
- Welch, R. A., M. E. Bauer, A. D. Kent, J. A. Leeds, M. Moayeri, L. B. Regassa, y D. L. Swenson. 1995. Battling against host phagocytes: the wherefore of the RTX family of toxins? *Infect. Agents Dis.* 4: 254-272.
- Welch, R. A., y S. Pellett. 1988. Transcriptional organization of the *Escherichia coli* hemolysin genes. *J. Bacteriol.* 170: 1622-1630.
- Wheatcroft, R., D. G. McRae, y R. W. Miller. 1990. Changes in the *Rhizobium meliloti* genome and the ability to detect supercoiled plasmids during bacteroid development. *Mol. Plant Microbe Interact.* 3: 9-17.
- Whitehead, N., A. M. L. Barnard, H. Slater, N. J. L. Simpson, y G. P. C. Saldmon. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 365-404.
- Wijffelman, C. A., E. Pees, A. A. N. van Brussel, y P. J. J. Hooykaas. 1983. Repression of *small* bacteriocin excretion in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii* by transmissible plasmids. *Mol. Gen. Genet.* 192: 171-176.
- Wilkinson, A., V. Danino, F. Wisniewski-Dye, J. K. Lithgow, y J. A. Downie. 2002. *N*-acyl-homoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two quorum-sensing genes that regulate plasmid transfer. *J. Bacteriol.* 184: 4510-4519.
- Willems, A., M. Fernández-López, E. Muñoz-Adelantado, J. Goris, P. De Vos, E. Martínez-Romero, N. Toro, y M. Gillis. 2003. Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1207-1217.
- Williams, R. M., y S. Rimsky. 1997. Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein H-NS: a central controller of gene regulatory networks. *FEMS Microbiol. Lett.* 156: 175-185.
- Wilson, J. K. 1944. Over five hundred reasons for abandoning the cross-inoculation groups of legumes. *Soil Sci.* 58: 61-69.
- Wilson, R. A., B. A. Handley, y J. E. Beringer. 1998. Bacteriocin production and resistance in a field population of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Soil Biol. Biochem.* 30: 413-417.
- Wisniewski-Dye, F., J. Jones, S. R. Chhabra, y J. A. Downie. 2002. *railR* genes are part of a quorum-sensing network controlled by *cinI* and *cinR* in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 184: 1597-1606.
- Wolanin, P. M., P. A. Thomason, y J. B. Stock. 2002. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.* 3: reviews3013.1-3013.8.
- Xu, L. M., C. Ge, Z. Cui, J. Li, y H. Fan. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 706-711.
- Yamada, H., S. Muramatsu, y T. Mizuno. 1990. An *Escherichia coli* protein that preferentially binds to sharply curved DNA. *J. Biochem. (Tokyo)* 108: 420-425.
- Yamada, H., T. Yoshida, K. Tanaka, C. Sasakawa, y T. Mizuno. 1991. Molecular analysis of the *Escherichia coli* *hns* gene encoding a DNA binding protein, which preferentially recognizes curved DNA sequences. *Mol. Gen. Genet.* 230: 332-336.
- Yao, Z. Y., F. L. Kan, E. T. Wang, G. H. Wei, y W. X. Chen. 2002. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 2219-2230.
- Yost, C. K., P. Rochepeau, y M. F. Hynes. 1998. *Rhizobium leguminosarum* contains a group of genes that appear to code for methyl-accepting chemotaxis proteins. *Microbiology* 144: 1945-1956.
- Young, J. M. 2003. The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination "*Sinorhizobium adhaerens*" (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 2107-2110.
- Young, J. M. 2004. Renaming of *Agrobacterium larrymoorei* Bouzar and Jones 2001 as *Rhizobium larrymoorei* (Bouzar and Jones 2001) comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 149.

- Young, J. M., L. D. Kuykendall, E. Martínez-Romero, A. Kerr, y H. Sawada. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 89-103.
- Young, J., e I. B. Holland. 1999. ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on. *Biochim. Biophys. Acta* 1461: 177-200.
- Yu, R. R., y V. J. DiRita. 2002. Regulation of gene expression in *Vibrio cholerae* by ToxT involves both antirepression and RNA polymerase stimulation. *Mol. Microbiol.* 43: 119-134.
- Zambon, J. J. 1985. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 12: 1-20.
- Zdor, R. E., y S. G. Pueppke. 1991. Nodulation competitiveness of Tn5-induced mutants of *Rhizobium fredii* 208 that are altered in motility and extracellular polysaccharide production. *Can. J. Microbiol.* 37: 52-58.
- Zgurskaya, H. L., y H. Nikaido. 2000. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol. Microbiol.* 37: 219-225.
- Zhang, A., S. Rimsky, M. E. Reaban, H. Buc, y M. Belfort. 1996a. *Escherichia coli* protein analogs StpA and H-NS: regulatory loops, similar and disparate effects on nucleic acid dynamics. *EMBO J.* 15: 1340-1349.
- Zhang, F., Y. Yin, C. H. Arrowsmith, y V. Ling. 1995. Secretion and circular dichroism analysis of the C-terminal signal peptides of HlyA and LktA. *Biochemistry.* 34: 4193-4201.
- Zhang, L. T., E. Jackson-Machelski, y J. I. Gordon. 1996b. Biochemical studies of *Saccharomyces cerevisiae* myristoyl-coenzyme A: protein *N*-myristoyltransferase mutants. *J. Biol. Chem.* 271: 33131-33140.