

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



**SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN  
DE MUTANTES DE *Rhizobium  
tropici* CIAT899 AFECTADOS EN LA  
PRODUCCIÓN DE FACTORES NOD  
EN CONDICIONES DE ESTRÉS  
SALINO**

BEATRIZ GUASCH VIDAL  
TESIS DOCTORAL  
SEVILLA, 2011



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA



**SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE  
*Rhizobium tropici* CIAT899 AFECTADOS EN LA  
PRODUCCIÓN DE FACTORES NOD EN CONDICIONES DE  
ESTRÉS SALINO**

Memoria presentada por la Licenciada en  
Biología **BEATRIZ GUASCH VIDAL** para  
optar al grado de Doctora en Biología.

Sevilla, 2011.



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA



Memoria realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla que presenta la Licenciada en Biología BEATRIZ GUASCH VIDAL para optar al grado de Doctora en Biología.

Los Directores,

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "M. del Rosario Espuny Gómez".

Fdo.: María del Rosario Espuny Gómez

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Ramón A. Bellogín Izquierdo".

Fdo.: Ramón Andrés Bellogín Izquierdo

La Doctoranda,

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Beatriz Guasch Vidal".

Fdo.: Beatriz Guasch Vidal

Sevilla, 2011.



“ Trata de ser el que nunca se da por vencido,  
el que siempre da un paso adelante, el que confía  
en su trabajo y no en la suerte, el que soporta el peso  
de sus obligaciones y las lleva a cabo con la  
sencilla elegancia de los vencedores”



## MI AGRADECIMIENTO

---

A todos los que, con mayor o menor implicación, habeis estado conmigo. Sin vosotros el recuerdo que me queda de todos estos años no sería el mismo. En concreto, quiero dar las gracias:

A todos los integrantes del Departamento de Microbiología de la facultad de Biología, en el que he realizado la mayor parte de este trabajo.

En primer lugar quiero agradecer a Ramón el acogerme como alumna de colaboración en el departamento hace ya cinco años. Sin tu amabilidad esto no hubiera sido posible. Gracias por acogerme y preocuparte por mí. Gracias por permitirme seguir creciendo.

A Charo, por aceptar la dirección de esta Tesis y asumir con Ramón esa gran responsabilidad. Gracias por el esfuerzo que has hecho. Gracias por las horas que me has dedicado.

A mi compañero Paquito, por haberme hecho reír todos los días y por tantos momentos compartidos, en nuestro laboratorio y fuera de él. He estado muy a gusto contigo todo este tiempo. He aprendido mucho contigo y de ti. Gracias por ser mi compañero de verdad, preocuparte por mí, haber sabido escuchar mis silencios y, en ocasiones, ponerles voz. Te agradezco enormemente el apoyo que me has hecho sentir a tu lado.

A Ollero, por tu compañía, comentarios y opiniones y por iniciarme en el mundo de la Biología Molecular. Igualmente, gracias Javi, por el apoyo que me supuso una primera publicación.

A todos los alumnos internos que dedicaron parte de su tiempo en ayudarme. Gracias muy especialmente a Ani, por tu entusiasmo y dinamismo, por tu ayuda y compañía en aquellos momentos de tanto repetir y repetir, contar y contar y contar nódulos... Gracias por tu amistad. Gracias a Irene y a Izco por colaborar en mi trabajo. A Macarena por tu optimismo, tu apoyo y por los momentos compartidos. Gracias también a Miyuki por tus esfuerzos con los cósmidos, y a Luismi por tu apoyo con las complementaciones. Gracias por vuestra compañía tantas mañanas y tardes de trabajo. Os deseo toda la suerte del mundo.

A mis compañeros del L4; Isa, Juan Carlos y Abi. Gracias por compartir vuestras experiencias conmigo y por apoyarme cuando lo he necesitado. Gracias Jose María por tu atención cuando me hizo falta. Gracias Ana por mostrarme siempre una sonrisa, y Teresa por soportar mis “salidas nocturnas” en los primeros congresos y por tu disposición y colaboración siempre que fue necesario.

A Edu, por tu amabilidad y tu sentido del humor. A Carmen por tu forma de ser, por tu alegría y por tu amistad, que se ha dejado sentir todo el tiempo. Han pasado muchas cosas y siempre he sabido que estabas, y que sigues ahí. A Monre, por tus palabras de ánimo.

A M<sup>a</sup> del Mar por compartir conmigo esos ratitos para charlar y ponernos al día sobre cómo nos iban las cosas. Gracias por tu apoyo, especialmente al final. Igualmente quiero dar las gracias a Joaquín, Serva, Cristina, Paco y María por vuestra cercanía.

A Rocío y a Nuria por vuestras risas diarias, y porque parte de vuestro trabajo ha permitido que yo pudiera hacer el mío aquí. Gracias Rocío por transmitir siempre tanta alegría, y Nuria por tu espontaneidad e interés por saber siempre cómo me iba todo. Gracias también a Ángeles, por tu compañía en aquellos lejanos “cursos de doctorado”, en los que nos conocimos, y por el apoyo y cariño que demuestras siempre. Gracias a Inés, sobretodo por tus ánimos al final y por ayudarme con los papeleos, que tanto ajeteo me suelen causar.

A todos los integrantes del Departamento de Microbiología y Parasitología de la facultad de Farmacia. Especialmente a Manolo Megías, por haber solicitado el proyecto sin el cual esta Tesis no existiría. Gracias por tus esfuerzos, por tu apoyo y por valorarme. Gracias a Belén y a Jana, por enseñarme en un principio a trabajar con CIAT899 y los secretos de las cromatografías. Aquellos comienzos no pudieron ser mejores. Gracias a todo el equipo que poco a poco fui conociendo en Farmacia; Laura, Esaú, Fran, Serra, Isabel... por recibirme siempre con una sonrisa las repetidas veces que he tenido que trabajar allí. Muy especialmente agradezco a Hamid todo el apoyo y comprensión que me ha regalado durante estos años. Sin duda esta Tesis ha avanzado gracias a ti, a tu interés y a que me he sentido reforzada por tí miles de veces. Gracias por preocuparte más que nadie por mi estado de ánimo y por saber parar y escucharme en todo momento. Gracias por compartir tu experiencia conmigo. Una vez me dijiste que “nadie es esencial”... pero creo que en eso has sido la excepción. No sé qué hubiera pasado si no hubiera podido contar contigo. Gracias por escuchar mi opinión como una más desde el principio y hasta el final. También quiero dar las gracias al Profesor Ton van Brussel, de la Universidad de Leiden, por escucharme y no dudar en ayudarme especialmente al final. Gracias por pensar en mí y en mi trabajo, y por reaccionar para que, al menos mi esfuerzo, se vea recompensado científicamente algún día.

A los integrantes del Departamento de Química Orgánica de la facultad de Química. Agradezco el buen humor de Antonio Gil y la colaboración de Miguel Ángel, Maru, Sergio y Rocío. Gracias por vuestras explicaciones y por vuestra presencia en las reuniones. Gracias Maru por tu paciencia en la etapa final. Gracias Miguel Ángel por tu profesionalidad.

A los miembros del I.F.A.P.A. del Centro Las Torres-Tomejil: Dulce, María Camacho, Mari Carmen, Marta y Paco Temprano. Os agradezco vuestro buen trato y todo el cariño y atención que me habeis prestado. Gracias por vuestra colaboración en los test de nodulación, competitividades y cinéticas. Gracias Mari Carmen por tu ayuda en los estudios de colonización. Gracias María, por tu colaboración y ayuda con los análisis estadísticos y por el optimismo que me has transmitido siempre.

Con especial cariño, a todos los integrantes del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y del Departamento de Genética del Centro Politécnico de la Universidad Federal de Paraná, Curitiba, donde realicé mi estancia. En primer lugar, al Profesor Emanuel Maltempi de Souza, por acogerme tan amablemente en tu laboratorio. Gracias por tu dedicación, tus sugerencias, por saber escuchar y sobre todo, por la oportunidad que me diste. Gracias a ello pude conocer y valorar otros ambientes de trabajo, y confirmé que el éxito está en uno mismo, no en los resultados. Gracias a la Profesora Roseli Wassem, por ser mi amiga y por guiarme y ayudarme como te fue posible con los experimentos que hice en Brasil. Gracias por tus esfuerzos y por tu cercanía. Es difícil expresar lo que se siente cuando uno está tan lejos. Todo, por simple que fuera, significó mucho para mí. Mis felicitaciones a Paloma, Poli, Vanesa... porque trabajar en vuestro laboratorio fue todo un placer. Estoy muy agradecida a Marina, por tu gran profesionalidad y tu sonrisa. Parece mentira que sin entendernos en un principio

llegáramos finalmente a encajar tan bien. Sin tí aquellos meses no hubieran sido lo mismo, fuiste mi ejemplo a seguir. Agradezco igualmente a Lucas, Fábio, Renato, Marco, Vivian, Giovana, Marcelo, Valter... y demás estudiantes de Maestría y Doctorado del departamento el buen ambiente de trabajo. También agradezco a Cecilia su simpatía y el poder hablar en español con fluidez de vez en cuando. Aún estando tan lejos y, sólo siendo como sois, conseguísteis que me sintiera todavía mejor que en casa. Gracias en especial a Arnaldo, por tu ayuda con el alojamiento desde el principio y tu tremenda amabilidad en todo momento, siempre pendiente de que todo me fuera bien. Gracias a Vinicius y a Dragan por aquellos estupendos ratos de charla en “portofiol”, y a Pet por su maravillosa compañía. Os extraño muchísimo a todos.

Agradezco la ayuda desinteresada que me prestaron ciertas personas a las que tuve que recurrir en momentos muy puntuales de la realización de la Tesis, sobretodo cuando estuve en Brasil, tan lejos de casa. Agradezco a la Dra. Georgina Hernández, de la U.N.A.M, su amabilidad y disposición cuando la necesité. Fue un placer conocerla y degustar tus dulces mexicanos allí en Brasil. También estoy muy agradecida a la Dra. Esperanza Martínez y al Dr. Ernesto Ormeño, de la U.N.A.M, por las secuencias cedidas, por responderme y colaborar con rapidez para que pudiera culminar los trabajos de proteómica en la etapa final de mi estancia. Agradezco a Jose Ignacio Jiménez Zurdo, de la Estación Experimental del Zaidín, la ayuda que me prestó en el tema de los ARN reguladores. Desde que logré contactar con cada uno de vosotros vuestra ayuda fue inmediata, os volcasteis sin necesidad de conocerme, dejé de sentirme sola, y sólo por eso todo volvió a cobrar sentido. Vuestro pequeño gesto fue muy importante para mí, haciéndome crecer más incluso a nivel personal que profesional. Gracias por escucharme y por vuestra pequeña aportación. Igualmente agradezco a la Profesora Isabel López Calderón y al Profesor Carlos Romero, de la Universidad de Sevilla, su ayuda con la nomenclatura de los genes y de las plantas, respectivamente.

También quiero dar las gracias a mis padres. Gracias por la educación que me habeis dado y por todos los esfuerzos que habeis hecho por mí. Gracias por entender que, a pesar de todo, no pueda conformarme con las cosas. Gracias también a mis hermanas y mis cuñados por estar ahí. Gracias a mis primos y tíos por aceptarme como soy. A mi abuela por todo lo que es, por animarme y apoyarme desde pequeña, por ser “la que más me quiere”, enseñarme a superar mis miedos y a reírme de las cosas. Gracias a Antonio, Queti, y a mi cuñado Antonio por todo vuestro cariño y por cuidarme. Gracias a mis amigos y compañeros de facultad Inma, Merchi, Aida, Hayat, Tamara, Adrian... por vuestro interés, y por todo vuestro apoyo cuando me hizo falta.

Por último, y más especialmente, quiero dar las gracias a mi novio, Jesús, por creer siempre en mí y por haber soportado una buena parte de lo que me ha supuesto este trabajo. Gracias por poner de tu parte para comprenderme. Gracias por aportarme tu visión objetiva de las cosas y por reforzar mi autoestima tantísimas veces. Gracias por acompañarme también en esta etapa, y por ser la persona junto a la que voy consiguiendo hacer realidad todos y cada uno de mis sueños.





Mi reconocimiento a la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía y a la Universidad de Sevilla, por haber hecho posible la realización del presente trabajo.



## ABREVIATURAS, UNIDADES Y SÍMBOLOS

AcN	Acetonitrilo
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
AIA	Ácido indolacético
APS	Persulfato de amonio
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BFP	Proteína con fluorescencia azul
BSA	Albúmina de suero bovino
bv.	Biovariedad
CAS	Cromo-azurol S
CCF-R	Cromatografía en capa fina en fase reversa
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfonato
cv.	Cultivar
DIG	Digoxigenina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDDHA	Ácido etilendiamino -N,N'-bis 2-hidroxifenilacético
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ENOD	Nodulina temprana
EPS	Exopolisacárido
FBN	Fijación biológica del nitrógeno
GC	Glucano cíclico
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GFP	Proteína con fluorescencia verde
GlcNAc	<i>N</i> -acetil-D-glucosamina
GOGAT	Glutamina-oxoglutarato aminotransferasa o glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
HB	Hidrofóbico
HCCA	$\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico
HDTMA	Hexadeciltrimetilamonio
HF	Hidrofílico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Hsp	Proteína de choque térmico
IDA	Information-Dependent Acquisition
IPG	Gradiente inmovilizado de pH
KPS	Polisacárido capsular tipo antígeno K
kV	Kilovoltio
L.	Linneo
<i>Lam.</i>	Lamarck
LCO	Lipoquitoligosacárido
LPS	Lipopolisacárido

MALDI	Espectrometría de masa por desorción-ionización mediante láser asistida por matriz
MS	Espectrometría de masas
m/v	Unidad de masa por unidad de volumen
m/z	Unidad de masa/carga en Espectrometría de Masas
NBT	Nitroazul tetrazolio
Nop	Nodulation outer protein
ONPG	Ortohitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIPES	Ácido piperacín-1,4-bis(2-etanosulfónico)
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluorido
pSym	Plásmido simbiótico
QS	Quorum sensing
REase	Endonucleasa de restricción
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
sp./spp.	Especie/s
SPE	Extracción en fase sólida
SPS	Polisacáridos superficiales
sRNA	Pequeños ARN reguladores
subsp.	Subespecie
TEMED	Tetrametiletiléndiamina
TFA	Trifluoracético
T <sub>m</sub>	Temperatura de fusión
TOF	Time of flight
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
U.F.C.	Unidad formadora de colonia
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido
~	Aproximadamente
$\lambda$	Longitud de onda
$\mu$ Ci	Microcurio
$\mu$ E	Microeinstein
$\Omega$	Omega
$\sigma$	Sigma

# *Índices*

---



<b>I. INTRODUCCIÓN.-</b>	<b>-1-</b>
<b>1. La fijación biológica del nitrógeno</b> .....	<b>- 3 -</b>
<b>2. La simbiosis de los rizobios con las leguminosas</b> .....	<b>- 5 -</b>
2.1. La especificidad de la relación .....	- 6 -
2.2. Establecimiento de la simbiosis.....	- 7 -
2.3. Tipos de nódulos .....	- 10 -
2.4. La fijación del nitrógeno en los nódulos.....	- 11 -
<b>3. Señales moleculares implicadas en el establecimiento de la simbiosis</b> .....	<b>- 12 -</b>
3.1. Los flavonoides .....	- 12 -
3.2. Los factores Nod .....	- 14 -
3.2.1. Los genes de nodulación .....	- 15 -
3.2.1.1. Regulación de la expresión de los genes de nodulación .....	- 19 -
3.2.1.1.1. El gen regulador <i>nodD</i> .....	- 19 -
3.2.1.1.2. Otros genes reguladores .....	- 21 -
3.2.2. Percepción y actividad biológica de los factores Nod .....	- 22 -
3.3. Los polisacáridos superficiales.....	- 25 -
3.3.1. Los $\beta$ -glucanos cíclicos.....	- 25 -
3.3.2. Los exopolisacáridos.....	- 26 -
3.3.3. Los lipopolisacáridos .....	- 28 -
3.3.4. Los polisacáridos capsulares .....	- 30 -
3.4. Las proteínas extracelulares .....	- 31 -
3.5. Las moléculas implicadas en la percepción del quórum.....	- 32 -
<b>4. Factores abióticos que afectan a la simbiosis de los rizobios con las leguminosas. La salinidad</b> .....	<b>- 34 -</b>
<b>5. Regulación del metabolismo del nitrógeno en los rizobios</b> .....	<b>- 36 -</b>
5.1. La proteína GlnD .....	- 39 -
<b>6. El macrosimbionte. <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Leucaena leucocephala</i></b> .....	<b>- 42 -</b>
<b>7. El microsimbionte. <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899</b> .....	<b>- 43 -</b>
<b>II. OBJETIVOS.-</b>	<b>-49-</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.-</b>	<b>-53-</b>
<b>1. Material biológico</b> .....	<b>- 55 -</b>
1.1. Bacterias y plásmidos.....	- 55 -
1.2. Plantas .....	- 60 -
<b>2. Antibióticos, flavonoides y tampones</b> .....	<b>- 60 -</b>
<b>3. Medidas de pH y espectrofotométricas</b> .....	<b>- 61 -</b>
<b>4. Medios de cultivo</b> .....	<b>- 61 -</b>
4.1. Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i> .....	- 62 -
4.2. Medios de cultivo para <i>Rhizobium</i> .....	- 62 -
<b>5. Condiciones de cultivo</b> .....	<b>- 63 -</b>
5.1. Condiciones de cultivo para <i>E. coli</i> .....	- 63 -
5.2. Condiciones de cultivo para <i>Rhizobium</i> .....	- 63 -

<b>6. Conservación de las bacterias</b> .....	- 64 -
<b>7. Técnicas de Biología Molecular</b> .....	- 64 -
7.1. Aislamiento de ácidos nucleicos .....	- 64 -
7.1.1. Aislamiento del ADN genómico .....	- 64 -
7.1.2. Aislamiento del ADN plasmídico.....	- 65 -
7.1.2.1. Aislamiento del ADN de plásmidos con alto número de copias .....	- 65 -
7.1.2.2. Aislamiento del ADN de cósmidos y de plásmidos con bajo número de copias .....	- 66 -
7.1.3. Aislamiento del ARN.....	- 66 -
7.2. Procesamiento enzimático del ADN.....	- 66 -
7.2.1. Restricción del ADN .....	- 66 -
7.2.2. Desfosforilación de vectores de clonación .....	- 66 -
7.2.3. Ligación del ADN.....	- 67 -
7.3. Purificación del ADN mediante extracción fenólica .....	- 67 -
7.4. Precipitación del ADN .....	- 68 -
7.5. Electroforesis del ADN.....	- 68 -
7.5.1. Electroforesis de plásmidos de alto peso molecular .....	- 69 -
7.6. Extracción y purificación del ADN a partir de geles de agarosa .....	- 70 -
7.7. Hibridación ADN/ADN .....	- 70 -
7.7.1. Preparación de la sonda.....	- 70 -
7.7.2. Transferencia del ADN al filtro de nylon .....	- 71 -
7.7.3. Hibridación con la sonda marcada.....	- 72 -
7.7.3.1. Prehibridación .....	- 72 -
7.7.3.2. Hibridación .....	- 72 -
7.7.4. Eliminación de la sonda no unida.....	- 72 -
7.7.5. Detección inmunológica de la sonda .....	- 73 -
7.8. Amplificación del ADN mediante PCR .....	- 74 -
7.8.1. Reacciones de PCR convencional .....	- 74 -
7.8.2. Reacciones de RT-PCR cuantitativa.....	- 75 -
7.8.2.1. Análisis de datos .....	- 76 -
7.8.3. Diseño de cebadores.....	- 76 -
7.8.3.1. Cebadores utilizados en reacciones de PCR convencional .....	- 76 -
7.8.3.2. Cebadores utilizados en reacciones de RT-PCR.....	- 77 -
7.9. Cuantificación de Ácidos nucleicos .....	- 78 -
7.10. Retrotranscripción .....	- 78 -
7.11. Secuenciación del ADN .....	- 79 -
7.12. Análisis informático de las secuencias de ADN .....	- 79 -
<b>8. Técnicas microbiológicas</b> .....	- 79 -
8.1. Curvas de crecimiento.....	- 79 -
8.2. Métodos de transferencia del ADN a las bacterias .....	- 80 -
8.2.1. Conjugación .....	- 80 -
8.2.2. Transformación .....	- 80 -
8.3. Ensayos de actividad $\beta$ -galactosidasa.....	- 81 -
8.3.1. Ensayos en medio líquido.....	- 81 -
8.3.1.1. Ensayos en placas de microtítulo.....	- 82 -
8.3.2. Ensayos en medio sólido .....	- 82 -

8.4. Detección de la producción de sideróforos.....	- 83 -
8.5. Prueba bioquímica de la nitrato reductasa .....	- 84 -
8.6. Ensayos de movilidad .....	- 84 -
8.7. Análisis de la producción de autoinductores (AHL).....	- 84 -
<b>9. Estudio de los factores Nod.....</b>	<b>- 85 -</b>
9.1. Cromatografía en capa fina en fase reversa (CCF-R).....	- 85 -
9.2. Análisis estructural de los factores Nod .....	- 86 -
<b>10. Estudio de las proteínas bacterianas.....</b>	<b>- 87 -</b>
10.1. Extracción de proteínas .....	- 87 -
10.1.1. Preparación del extracto celular .....	- 87 -
10.1.2. Lisis celular .....	- 87 -
10.2. Cuantificación de proteínas .....	- 88 -
10.3. Electroforesis de proteínas .....	- 88 -
10.3.1. Electroforesis unidimensional de proteínas .....	- 88 -
10.3.2. Electroforesis bidimensional de proteínas .....	- 90 -
10.3.2.1. Isoelectroenfoque (IEF).....	- 90 -
10.3.2.2. Equilibrio de las tiras.....	- 91 -
10.3.2.3. Electroforesis SDS-PAGE.....	- 92 -
10.4. Tinción de las proteínas con azul de Coomassie .....	- 93 -
10.5. Análisis de los geles bidimensionales.....	- 93 -
10.6. Secuenciación de las proteínas .....	- 93 -
10.6.1. Digestión con tripsina en gel de poliacrilamida.....	- 93 -
10.6.2. Análisis por espectrometría de masas.....	- 94 -
<b>11. Estudio de los polisacáridos superficiales bacterianos (SPS).....</b>	<b>- 95 -</b>
11.1. Extracción y cuantificación de los exopolisacáridos (EPS).....	- 95 -
11.1.1. Análisis estadístico.....	- 95 -
11.2. Análisis de los lipopolisacáridos (LPS).....	- 95 -
11.2.1. Extracción del LPS.....	- 95 -
11.2.2. Electroforesis del LPS.....	- 96 -
11.2.3. Tinción del LPS .....	- 97 -
11.3. Análisis de los polisacáridos capsulares tipo antígeno K (KPS).....	- 98 -
11.3.1. Extracción del KPS .....	- 98 -
11.3.2. Electroforesis del KPS .....	- 98 -
11.3.3. Tinción del KPS .....	- 99 -
<b>12. Ensayos con plantas .....</b>	<b>- 100 -</b>
12.1. Solución nutritiva para plantas .....	- 100 -
12.2. Desinfección y germinación de semillas .....	- 100 -
12.3. Ensayos de nodulación .....	- 101 -
12.3.1. Masa seca de la parte aérea de las plantas .....	- 101 -
12.3.2. Número de nódulos .....	- 101 -
12.3.3. Masa seca de los nódulos .....	- 101 -
12.3.4. Análisis estadístico.....	- 102 -
12.4. Ensayos de competitividad en nodulación.....	- 102 -
12.4.1. Aislamiento de las bacterias de los nódulos .....	- 102 -
12.5. Ensayos de colonización de la superficie de la raíz .....	- 102 -

## IV. RESULTADOS.-

-105-

<b>1. Estudio del crecimiento de <i>R. tropici</i> CIAT899 bajo estrés salino</b> .....	- 107 -
<b>2. Obtención de mutantes afectados en la expresión de los genes <i>nod</i> bajo estrés salino</b> .....	- 108 -
2.1. Mutagénesis al azar con Tn5-Mob .....	- 109 -
2.2. Determinación de las condiciones óptimas para realizar los ensayos de actividad $\beta$ -galactosidasa .....	- 109 -
2.3. Mutantes derivados de <i>R. tropici</i> RSP3051 .....	- 110 -
2.4. Mutantes derivados de <i>R. tropici</i> CIAT899[pMP240] .....	- 112 -
<b>3. Selección de los mutantes afectados en la producción de factores Nod bajo estrés salino</b> .....	- 113 -
3.1. Curación del plásmido pMP240 en los mutantes Cp7, Cp8 y Cp9. Estudio de su perfil de plásmidos. Confirmación de la especie .....	- 115 -
3.2. Perfil de producción de factores Nod de los mutantes C8 y C9 .....	- 118 -
<b>4. Estudio y caracterización del mutante C8</b> .....	- 119 -
4.1. Localización de la inserción en el mutante C8 .....	- 119 -
4.1.1. Identificación y aislamiento del gen en el que se ha insertado el transposón Tn5-Mob en el mutante C8 .....	- 119 -
4.1.2. Organización génica de la región en la que se localiza la inserción .....	- 122 -
4.2. Estudio del crecimiento del mutante C8 .....	- 122 -
4.2.1. Estudio de la asimilación de nitrato en el mutante C8 .....	- 126 -
4.2.2. Inestabilidad de la inserción en medio mínimo B <sup>-</sup> .....	- 128 -
4.2.2.1. Caracterización de dos clones seleccionados al azar .....	- 131 -
4.3. Estudio de los factores Nod producidos por el mutante C8 .....	- 134 -
4.3.1. Perfil de factores Nod del mutante C8 en medio RMM con diferentes fuentes de nitrógeno .....	- 134 -
4.3.2. Perfil de factores Nod del mutante C8 en medio mínimo B <sup>-</sup> suplementado con glutamina .....	- 138 -
4.3.3. Análisis estructural de los factores Nod producidos por el mutante C8 .....	- 139 -
4.3.3.1. Análisis estructural de los factores Nod producidos por <i>R. tropici</i> CIAT899 y el mutante C8 en medio mínimo B <sup>-</sup> con glutamina .....	- 143 -
4.4. Estudio de los componentes superficiales del mutante C8 .....	- 152 -
4.4.1. Morfología de las colonias del mutante C8 .....	- 152 -
4.4.2. Análisis de la producción de exopolisacáridos .....	- 152 -
4.4.2.1. Análisis de la producción de EPS en medio líquido .....	- 152 -
4.4.2.2. Análisis de la producción de EPS en medio sólido .....	- 155 -
4.4.3. Análisis del perfil de lipopolisacáridos .....	- 155 -
4.4.4. Análisis del perfil de polisacáridos capsulares tipo antígeno K .....	- 156 -
4.5. Estudio de la expresión del gen <i>glnD</i> .....	- 157 -
4.6. Estudio de la movilidad del mutante C8. El gen <i>mviN</i> .....	- 158 -
4.7. Estudio de la producción de sideróforos por el mutante C8 .....	- 161 -
4.8. Estudio de la producción de AHL por el mutante C8 .....	- 162 -
4.9. Estudio de las propiedades simbióticas del mutante C8 .....	- 163 -
4.9.1. Eficiencia en la nodulación .....	- 163 -
4.9.2. Competitividad por la nodulación .....	- 165 -

4.10. Complementación de la mutación en el gen <i>glnD</i> .....	166 -
<b>5. Estudio y caracterización del mutante C9</b> .....	171 -
5.1. Localización de la inserción en el mutante C9 .....	171 -
5.1.1. Identificación y aislamiento del gen en el que se ha insertado el transposón Tn5-Mob en el mutante C9.....	171 -
5.1.2. Organización génica de la región en la que se localiza la inserción.....	174 -
5.2. Estudio del crecimiento del mutante C9 .....	174 -
5.3. Análisis estructural de los factores Nod producidos por el mutante C9.....	175 -
5.4. Estudio de los componentes superficiales del mutante C9 .....	180 -
5.4.1. Morfología de las colonias del mutante C9 .....	180 -
5.4.2. Análisis de la producción de exopolisacáridos .....	180 -
5.4.2.1. Análisis de la producción de EPS en medio líquido .....	180 -
5.4.2.2. Análisis de la producción de EPS en medio sólido.....	181 -
5.4.3. Análisis del perfil de lipopolisacáridos.....	182 -
5.4.4. Análisis del perfil de polisacáridos capsulares tipo antígeno K.....	183 -
5.5. Estudio de la expresión del gen <i>bgvA</i> .....	183 -
5.6. Efectos de la mutación del gen <i>bgvA</i> en la expresión del gen <i>nodA</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899.....	184 -
5.7. Estudio de la producción de AHL por el mutante C9 .....	185 -
5.8. Estudio de las propiedades simbióticas del mutante C9 .....	186 -
5.8.1. Eficiencia en la nodulación .....	186 -
5.8.2. Competitividad por la nodulación .....	188 -
5.8.3. Colonización de la superficie de la raíz.....	189 -
5.9. Complementación de la mutación en el gen <i>bgvA</i> .....	189 -
5.10. Construcción de un mutante en el gen <i>bgvA</i> mediante mutagénesis dirigida.....	192 -
5.11. Estudio proteómico de <i>R. tropici</i> CIAT899 y del mutante C9 en condiciones de estrés salino.....	196 -

## V. DISCUSIÓN.-

-203-

<b>1. Obtención y selección de mutantes afectados en la producción de factores Nod bajo estrés salino</b> .....	206 -
<b>2. Estudio y caracterización del mutante C8</b> .....	207 -
2.1. Localización de la inserción .....	207 -
2.2. Crecimiento del mutante C8.....	208 -
2.3. Producción de factores Nod del mutante C8 .....	209 -
2.4. Los polisacáridos superficiales del mutante C8.....	214 -
2.5. Estudios de expresión del gen <i>glnD</i> .....	215 -
2.6. Efectos polares de la inserción .....	215 -
2.7. Fenotipo simbiótico del mutante C8.....	216 -
<b>3. Estudio y caracterización del mutante C9</b> .....	218 -
3.1. Localización de la inserción .....	218 -
3.2. Crecimiento del mutante C9.....	218 -
3.3. Producción de factores Nod del mutante C9 .....	218 -
3.4. Los polisacáridos superficiales del mutante C9.....	221 -
3.5. Expresión de los genes <i>nod</i> en el mutante C9 .....	221 -

	Página
3.6. Fenotipo simbiótico del mutante C9.....	- 222 -
3.7. Complementación y generación del mutante de forma dirigida.....	- 224 -
3.8. Análisis proteómico en condiciones de estrés salino .....	- 226 -
<b>VI. CONCLUSIONES.-</b>	<b>-231-</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.-</b>	<b>-235-</b>
<b>VIII. APÉNDICE.-</b>	<b>-259-</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

### INTRODUCCIÓN

<b>Figura I1.-</b> Ciclo del nitrógeno en la naturaleza. ....	- 3 -
<b>Figura I2.-</b> Etapas básicas del establecimiento de la simbiosis entre los rizobios y las leguminosas. ....	- 8 -
<b>Figura I3.-</b> Tipos de nódulos. ....	- 11 -
<b>Figura I4.-</b> Estructura química de los flavonoides apigenina y genisteína.....	- 13 -
<b>Figura I5.-</b> Diversidad estructural de los factores Nod producidos por los rizobios .....	- 15 -
<b>Figura I6.-</b> Ruta biosintética de los factores Nod de <i>Rhizobium</i> sp. NGR234.....	- 18 -
<b>Figura I7.-</b> Estructura química de los glucanos cíclicos de <i>B. japonicum</i> .....	- 26 -
<b>Figura I8.-</b> Estructura química de las unidades repetitivas presentes en los dos tipos de exopolisacáridos de <i>S. meliloti</i> y del exopolisacárido de <i>R. tropici</i> CIAT899..	- 27 -
<b>Figura I9.-</b> Estructura química del lipopolisacárido de <i>R. etli</i> CE3 .....	- 29 -
<b>Figura I10.-</b> Estructura química de la unidad polisacáridica repetitiva del KPS de <i>S. fredii</i> USDA257.....	- 30 -
<b>Figura I11.-</b> Estructura de autoinductores presentes en <i>Rhizobium</i> .....	- 34 -
<b>Figura I12.-</b> Modelo de la regulación mediada por la proteína GlnD en los rizobios .....	- 40 -
<b>Figura I13.-</b> Unidad repetitiva del antígeno O de <i>R. tropici</i> CIAT899 .....	- 45 -
<b>Figura I14.-</b> Mapa genético de los genes de nodulación de <i>R. tropici</i> CIAT899 .....	- 45 -
<b>Figura I15.-</b> Análisis mediante cromatografía en capa fina de los factores Nod producidos por <i>R. tropici</i> CIAT899 y <i>R. tropici</i> RSP82 en medio B <sup>-</sup> con y sin NaCl 300 mM .....	- 47 -
<b>Figura I16.-</b> Variabilidad estructural de los factores Nod producidos por <i>R. tropici</i> CIAT899 bajo estrés salino (NaCl 300 mM) .....	- 47 -

### MATERIAL Y MÉTODOS

<b>Figura M1.-</b> Marcadores de peso molecular empleados como patrones de referencia en los geles de electroforesis de ADN en esta Tesis .....	- 68 -
---	--------

### RESULTADOS

<b>Figura R1.-</b> Curvas de crecimiento de <i>R. tropici</i> CIAT899 en medio TY y en medio TY con NaCl 100, 200 y 300 mM.....	- 107 -
<b>Figura R2.-</b> Actividad β-galactosidasa en medio YMA de <i>R. tropici</i> CIAT899 y <i>R. tropici</i> RSP3051 procedentes de un precultivo crecido en medio YM con NaCl 300 mM.....	- 110 -

<b>Figura R3.-</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa de <i>R. tropici</i> RSP3051 en medio YM en condiciones control, con apigenina, y con NaCl 100, 200 y 300 mM .....	- 111 -
<b>Figura R4.-</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa de <i>R. tropici</i> CIAT899 y de <i>R. tropici</i> CIAT899[pMP240] en medio YMA con X-gal y apigenina. ....	- 111 -
<b>Figura R5.-</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa de <i>R. tropici</i> RSP3051 y de 9 clones derivados de ella por inserción de Tn5-Mob. ....	- 112 -
<b>Figura R6.-</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa de <i>R. tropici</i> CIAT899[pMP240] y de 16 clones derivados de ella por inserción de Tn5-Mob.....	- 113 -
<b>Figura R7.-</b> Análisis mediante cromatografía en capa fina de los factores Nod producidos por <i>R. tropici</i> CIAT899 y cuatro estirpes derivadas de <i>R. tropici</i> RSP3051 por inserción de Tn5-Mob, en medio B <sup>-</sup> y en medio B <sup>-</sup> con NaCl 300 mM .....	- 115 -
<b>Figura R8.-</b> Análisis mediante cromatografía en capa fina de los factores Nod producidos por <i>R. tropici</i> CIAT899 y cuatro estirpes derivadas de <i>R. tropici</i> CIAT899[pMP240] por inserción de Tn5-Mob, en medio B <sup>-</sup> y en medio B <sup>-</sup> con NaCl 300 mM.....	- 116 -
<b>Figura R9.-</b> Perfil de plásmidos de <i>R. tropici</i> CIAT899 y varias estirpes derivadas.....	- 117 -
<b>Figura R10.-</b> Amplificación por PCR de un fragmento del gen <i>nodD1</i> con los cebadores CIATnodD-F y CIATnodD-R y empleando como molde ADN genómico de <i>R. tropici</i> CIAT899 y de varias estirpes derivadas de ella. ....	- 118 -
<b>Figura R11.-</b> Análisis mediante cromatografía en capa fina de los factores Nod producidos por <i>R. tropici</i> CIAT899 y los mutantes C8 y C9 en medio B <sup>-</sup> y en medio B <sup>-</sup> con NaCl 300 mM .....	- 118 -
<b><u>ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE C8</u></b>	
<b>Figura R12.-</b> Comprobación mediante hibridación de la inserción del transposón Tn5-Mob en el genoma del mutante C8 .....	- 120 -
<b>Figura R13.-</b> Digestiones del plásmido pMUS1034 portador del fragmento rescatado del mutante C8.....	- 120 -
<b>Figura R14.-</b> Esquema de la región de ADN del mutante C8 en la que se insertó el transposón Tn5-Mob .....	- 121 -
<b>Figura R15.-</b> Amplificación por PCR del gen <i>glnD</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899 utilizando los cebadores GlnD5-GlnD3 (~ 3 kb) y GlnD5-TN5FR (~ 3,3 kb), y empleando como molde el ADN genómico de <i>R. tropici</i> CIAT899 y del mutante C8 .....	- 121 -
<b>Figura R16.-</b> Comprobación mediante hibridación de la inserción del transposón Tn5-Mob en el gen <i>glnD</i> en el mutante C8.....	- 122 -
<b>Figura R17.-</b> Esquema a escala de la organización génica de la región de ADN en la que se localiza el gen <i>glnD</i> en <i>R. tropici</i> CIAT899.....	- 122 -
<b>Figura R18.-</b> Curvas y parámetros de crecimiento de <i>R. tropici</i> CIAT899 y del mutante C8 en medio B <sup>-</sup> y medio B <sup>-</sup> con NaCl 300 mM.....	- 124 -
<b>Figura R19.-</b> Curvas y parámetros de crecimiento de <i>R. tropici</i> CIAT899 y del mutante C8 en medio RMM con KNO <sub>3</sub> , NH <sub>4</sub> Cl y glutamina como únicas fuentes de nitrógeno. ....	- 125 -

<b>Figura R20.-</b> Curvas y parámetros de crecimiento de <i>R. tropici</i> CIAT899 y del mutante C8 en medio B <sup>-</sup> con glutamina y en medio B <sup>-</sup> con glutamina y NaCl 300 mM.....	- 127 -
<b>Figura R21.-</b> Morfología de las colonias de <i>R. tropici</i> CIAT899 y del mutante C8 aisladas a partir de cultivos crecidos en medio B <sup>-</sup> durante 6 días.....	- 129 -
<b>Figura R22.-</b> Amplificación mediante PCR del gen <i>glnD</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899 utilizando los cebadores GlnD-5 y GlnD-3 y tomando como molde ADN genómico de <i>R. tropici</i> CIAT899 y de 20 colonias aisladas de un cultivo del mutante C8 crecido en medio B <sup>-</sup> con kanamicina durante 6 días. ....	- 130 -
<b>Figura R23.-</b> Amplificación mediante PCR de un fragmento de ~ 0,9 kb del gen de resistencia a la kanamicina del transposón Tn5-Mob utilizando los cebadores Kan-F y Kan-R y tomando como molde ADN genómico de <i>R. tropici</i> CIAT899 y de 20 colonias aisladas de un cultivo del mutante C8 crecido en medio B <sup>-</sup> con kanamicina durante 6 días.....	- 130 -
<b>Figura R24.-</b> Amplificación mediante PCR del gen <i>glnD</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899 utilizando los cebadores GlnD-5 y GlnD-3 y tomando como molde ADN genómico de <i>R. tropici</i> CIAT899 y de 10 colonias aisladas de un cultivo del mutante C8 crecido en medio B <sup>-</sup> con kanamicina y con glutamina durante 6 días .....	- 131 -
<b>Figura R25.-</b> Amplificación mediante PCR del gen de resistencia a la kanamicina del transposón Tn5-Mob utilizando los cebadores Kan-F y Kan-R y tomando como molde ADN genómico de <i>R. tropici</i> CIAT899 y de 10 colonias aisladas de un cultivo del mutante C8 crecido en medio B <sup>-</sup> con kanamicina y con glutamina durante 6 días .....	- 131 -
<b>Figura R26.-</b> Amplificación por PCR de un fragmento de ~ 0,9 kb del gen de resistencia a la kanamicina del transposón Tn5-Mob utilizando los cebadores Kan-F y Kan-R, y de un fragmento de ~ 650 pb del gen <i>nodD1</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899 utilizando los cebadores CIATnodD-F y CIATnodD-R, tomando como molde ADN genómico de <i>R. tropici</i> CIAT899 y de los dos clones del mutante C8. ....	- 132 -
<b>Figura R27.-</b> Análisis mediante cromatografía en capa fina de los factores Nod producidos por <i>R. tropici</i> CIAT899 y los dos clones del mutante C8 (C8g y tipo C8) en medio B <sup>-</sup> y en medio B <sup>-</sup> con NaCl 300 mM .....	- 133 -
<b>Figura R28.-</b> Comprobación mediante hibridación de la inserción del transposón Tn5-Mob en el genoma del clon C8g y del clon tipo C8 .....	- 133 -
<b>Figura R29.-</b> Análisis mediante cromatografía en capa fina de los factores Nod producidos por <i>R. tropici</i> CIAT899 y el mutante C8 en medio RMM con KNO <sub>3</sub> , NH <sub>4</sub> Cl y glutamina como únicas fuentes de nitrógeno, sin NaCl y con NaCl 300 mM .....	- 135 -
<b>Figura R30.-</b> Actividad β-galactosidasa de la fusión transcripcional <i>pnodA::lacZ</i> del plásmido pMP240 en <i>R. tropici</i> CIAT899[pMP240] y en el mutante Cp8 en medio RMM con KNO <sub>3</sub> , NH <sub>4</sub> Cl y glutamina en condiciones control, con apigenina, con NaCl 300 mM y con apigenina y NaCl 300 mM.....	- 137 -
<b>Figura R31.-</b> Análisis mediante cromatografía en capa fina de los factores Nod producidos por <i>R. tropici</i> CIAT899 y el mutante C8 en medio B <sup>-</sup> con glutamina en ausencia y presencia de NaCl 300 mM .....	- 138 -

<b>Figura R32.-</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa de la fusión transcripcional <i>pnodA::lacZ</i> del plásmido pMP240 en <i>R. tropici</i> CIAT899[pMP240] y el mutante Cp8 en medio B <sup>-</sup> con glutamina en condiciones control, con apigenina, con NaCl 300 mM y con apigenina y NaCl 300 mM .....	- 139 -
<b>Figura R33.-</b> Cromatogramas de HPLC-MS/MS de los factores Nod producidos por el mutante C8 en medio B <sup>-</sup> , medio B <sup>-</sup> con apigenina y medio B <sup>-</sup> con NaCl 300 mM .....	- 141 -
<b>Figura R34.-</b> Cromatogramas de HPLC-MS/MS de los factores Nod producidos por <i>R. tropici</i> CIAT899 en medio B <sup>-</sup> con glutamina, medio B <sup>-</sup> con glutamina y apigenina, y medio B <sup>-</sup> con glutamina y NaCl 300 mM .....	- 144 -
<b>Figura R35.-</b> Cromatogramas de HPLC-MS/MS de los factores Nod producidos por el mutante C8 en medio B <sup>-</sup> con glutamina, medio B <sup>-</sup> con glutamina y apigenina, y medio B <sup>-</sup> con glutamina y NaCl 300 mM .....	- 149 -
<b>Figura R36.-</b> Cuantificación del EPS producido por <i>R. tropici</i> CIAT899 y el mutante C8 en medios con nitrato como única fuente de nitrógeno en ausencia y presencia de NaCl 300 mM.....	- 153 -
<b>Figura R37.-</b> Cuantificación del EPS producido por <i>R. tropici</i> CIAT899 y el mutante C8 en medio RMM con NH <sub>4</sub> Cl y con glutamina como fuentes de nitrógeno en ausencia y presencia de NaCl 300 mM .....	- 154 -
<b>Figura R38.-</b> Aspecto de la mucosidad producida por <i>R. tropici</i> CIAT899 y el mutante C8 tras 5 días de crecimiento en placas de medio B <sup>-</sup> y medio RMM con distintas fuentes de nitrógeno .....	- 155 -
<b>Figura R39.-</b> Perfil de LPS de <i>R. tropici</i> CIAT899 y del mutante C8 en medio B <sup>-</sup> con y sin NaCl 300 mM .....	- 156 -
<b>Figura R40.-</b> Perfil de KPS de <i>R. tropici</i> CIAT899 y del mutante C8 en medio B <sup>-</sup> con y sin NaCl 300 mM .....	- 157 -
<b>Figura R41.-</b> Análisis por RT-PCR cuantitativa del ARNm extraído de <i>R. tropici</i> CIAT899 en medio RMM con KNO <sub>3</sub> , NH <sub>4</sub> Cl y glutamina.....	- 158 -
<b>Figura R42.-</b> Cuantificación relativa de la expresión del gen <i>glnD</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899 en medio B <sup>-</sup> , medio B <sup>-</sup> con apigenina, medio B <sup>-</sup> con NaCl 300 mM y medio B <sup>-</sup> con apigenina y NaCl 300 mM .....	- 159 -
<b>Figura R43.-</b> Amplificación por PCR de un fragmento de ~ 1600 pb del gen <i>mviN</i> y de un fragmento de ~ 4500 pb que contiene a los genes <i>glnD</i> y <i>mviN</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899 utilizando las parejas de cebadores MviN5-MviN3 y GlnD5-MviN3, respectivamente.....	- 159 -
<b>Figura R44.-</b> Análisis por RT-PCR cuantitativa del ARNm extraído de <i>R. tropici</i> CIAT899 y del mutante C8 en medio RMM con KNO <sub>3</sub> , NH <sub>4</sub> Cl y glutamina.....	- 160 -
<b>Figura R45.-</b> Efecto de la mutación del gen <i>glnD</i> en la movilidad de <i>R. tropici</i> CIAT899 .....	- 161 -
<b>Figura R46.-</b> Detección de la producción de sideróforos en <i>R. tropici</i> CIAT899 y en el mutante C8.....	- 162 -
<b>Figura R47.-</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa de <i>A. tumefaciens</i> NT1[pZLR4] crecida en YM con el sobrenadante de cultivos de <i>R. tropici</i> CIAT899 y del mutante C8 en medio RMM con KNO <sub>3</sub> , HN <sub>4</sub> Cl ó glutamina, con y sin NaCl 300mM....	- 163 -

<b>Figura R48.-</b> Plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa al mes y medio de la inoculación con <i>R. tropici</i> CIAT899 y con el mutante C8.....	- 164 -
<b>Figura R49.-</b> Plantas de <i>L. leucocephala</i> a los dos meses de la inoculación con <i>R. tropici</i> CIAT899 y con el mutante C8.....	- 165 -
<b>Figura R50.-</b> Efecto de la mutación del gen <i>glnD</i> en la capacidad competitiva de <i>R. tropici</i> CIAT899 por la ocupación de los nódulos en <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa .....	- 166 -
<b>Figura R51.-</b> Esquema de la construcción <i>in vitro</i> del plásmido pMUS1050 usado para complementar la mutación en el gen <i>glnD</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899 .....	- 167 -
<b>Figura R52.-</b> Curvas y parámetros de crecimiento de <i>R. tropici</i> CIAT899, el mutante C8, C8[pMUS1050] y C8[pMUS1068] en medio B <sup>-</sup> .....	- 168 -
<b>Figura R53.-</b> Análisis mediante cromatografía en capa fina de los factores Nod producidos por <i>R. tropici</i> CIAT899, el mutante C8, C8[pMUS1050] y C8[pMUS1068] en medio B <sup>-</sup> con y sin NaCl 300 mM .....	- 168 -
<b>Figura R54.-</b> Esquema de la construcción <i>in vitro</i> del plásmido pMUS1068 usado para complementar la mutación en el gen <i>glnD</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899 .....	- 169 -
<b>Figura R55.-</b> Capacidad competitiva de C8[pMUS1068] por la ocupación de los nódulos en <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa.....	- 170 -
<b><u>ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE C9</u></b>	
<b>Figura R56.-</b> Comprobación mediante hibridación de la inserción del transposón Tn5-Mob en el genoma del mutante C9 .....	- 171 -
<b>Figura R57.-</b> Digestiones del plásmido pMUS1031 portador del fragmento rescatado del mutante C9.....	- 172 -
<b>Figura R58.-</b> Esquema de la región de ADN del mutante C9 en la que se insertó el transposón Tn5-Mob .....	- 173 -
<b>Figura R59.-</b> Amplificación por PCR del gen <i>bgvA</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899 utilizando los cebadores Ara9143-F y Ara9143-R y empleando como molde ADN genómico de <i>R. tropici</i> CIAT899 y del mutante C9 .....	- 173 -
<b>Figura R60.-</b> Comprobación mediante hibridación de la inserción del transposón Tn5-Mob en el gen <i>bgvA</i> en el mutante C9 .....	- 174 -
<b>Figura R61.-</b> Esquema a escala de la organización génica de la región de ADN de <i>R. tropici</i> CIAT899 en la que se localiza el gen <i>bgvA</i> .....	- 174 -
<b>Figura R62.-</b> Curvas de crecimiento de <i>R. tropici</i> CIAT899 y del mutante C9 en medio B <sup>-</sup> , medio B <sup>-</sup> con apigenina y medio B <sup>-</sup> con NaCl 300 mM .....	- 176 -
<b>Figura R63.-</b> Cromatogramas de HPLC-MS/MS de los factores Nod producidos por el mutante C9 en medio B <sup>-</sup> con apigenina y medio B <sup>-</sup> con apigenina y NaCl 300 mM.....	- 178 -
<b>Figura R64.-</b> Aspecto de las colonias de <i>R. tropici</i> CIAT899 y del mutante C9 a los 3 días de cultivo en medio B <sup>-</sup> .....	- 180 -
<b>Figura R65.-</b> Cuantificación del EPS producido por <i>R. tropici</i> CIAT899 y el mutante C9 en medio B <sup>-</sup> , medio B <sup>-</sup> con apigenina y medio B <sup>-</sup> con NaCl 300 mM .....	- 181 -
<b>Figura R66.-</b> Aspecto de la mucosidad producida por <i>R. tropici</i> CIAT899 y el mutante C9 a los 5 días de crecimiento en medio B <sup>-</sup> , medio B <sup>-</sup> con apigenina y medio B <sup>-</sup> con NaCl 300 mM .....	- 182 -

<b>Figura R67.-</b> Perfil de LPS de <i>R. tropici</i> CIAT899 y del mutante C9 en medio B <sup>-</sup> , medio B <sup>-</sup> con apigenina, medio B <sup>-</sup> con NaCl 300 mM y medio B <sup>-</sup> con apigenina y NaCl 300 mM .....	- 182 -
<b>Figura R68.-</b> Perfil de KPS de <i>R. tropici</i> CIAT899 y del mutante C9 en medio B <sup>-</sup> , medio B <sup>-</sup> con apigenina, medio B <sup>-</sup> con NaCl 300 mM y medio B <sup>-</sup> con apigenina y NaCl 300 mM. ....	- 183 -
<b>Figura R69.-</b> Análisis por RT-PCR cuantitativa del ARNm extraído de <i>R. tropici</i> CIAT899 en medio B <sup>-</sup> , medio B <sup>-</sup> con apigenina, medio B <sup>-</sup> con NaCl 300 mM y medio B <sup>-</sup> con apigenina y NaCl 300 mM .....	- 184 -
<b>Figura R70.-</b> Cuantificación relativa de la expresión del gen <i>nodA</i> en <i>R. tropici</i> CIAT899 y en el mutante C9 en medio B <sup>-</sup> , medio B <sup>-</sup> con apigenina, medio B <sup>-</sup> con NaCl 300 mM y medio B <sup>-</sup> con apigenina y NaCl 300 mM.....	- 185 -
<b>Figura R71.-</b> Actividad β-galactosidasa de <i>A. tumefaciens</i> NT1[pZLR4] crecida en YM con el sobrenadante de cultivos de <i>R. tropici</i> CIAT899 y del mutante C9 en medio B <sup>-</sup> , medio B <sup>-</sup> con apigenina y medio B <sup>-</sup> con NaCl 300 mM.....	- 186 -
<b>Figura R72.-</b> Plantas de <i>P. vulgaris</i> L. cv. Negro Jamapa al mes y medio de la inoculación con <i>R. tropici</i> CIAT899 y con el mutante C9.....	- 187 -
<b>Figura R73.-</b> Plantas de <i>L. leucocephala</i> a los dos meses de la inoculación con <i>R. tropici</i> CIAT899 y con el mutante C9.....	- 188 -
<b>Figura R74.-</b> Capacidad competitiva de <i>R. tropici</i> CIAT899 y del mutante C9 por la ocupación de los nódulos de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa .....	- 188 -
<b>Figura R75.-</b> Microfotografía de fluorescencia de una raíz de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa colonizada por CIAT899[pMP4641] y C9[pMP4655] a la semana de su coinoculación sobre semillas pregerminadas .....	- 189 -
<b>Figura R76.-</b> Esquema de la construcción <i>in vitro</i> del plásmido pMUS1066 usado para complementar la mutación en el gen <i>bgvA</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899.....	- 191 -
<b>Figura R77.-</b> Análisis mediante cromatografía en capa fina de los factores Nod producidos por <i>R. tropici</i> CIAT899, CIAT899[pMUS1066], C9 y C9[pMUS1066] en medio B <sup>-</sup> con y sin NaCl 300 mM .....	- 192 -
<b>Figura R78.-</b> Esquema de la construcción <i>in vitro</i> del plásmido pMUS1067 usado para complementar la mutación en el gen <i>bgvA</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899.....	- 193 -
<b>Figura R79.-</b> Análisis mediante cromatografía en capa fina de los factores Nod producidos por <i>R. tropici</i> CIAT899, CIAT899[pMUS1067], C9 y C9[pMUS1067] en medio B <sup>-</sup> con y sin NaCl 300 mM .....	- 194 -
<b>Figura R80.-</b> Esquema de la mutagénesis <i>in vitro</i> del gen <i>bgvA</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899 mediante la inserción del interposón Ω .....	- 195 -
<b>Figura R81.-</b> Comprobación mediante hibridación de la construcción de un mutante de <i>R. tropici</i> CIAT899 en el gen <i>bgvA</i> .....	- 196 -
<b>Figura R82.-</b> Análisis mediante cromatografía en capa fina de los factores Nod producidos por <i>R. tropici</i> CIAT899 y los mutantes C9 y SVQ689 en medio B <sup>-</sup> y medio B <sup>-</sup> con NaCl 300 mM.....	- 197 -
<b>Figura R83.-</b> Perfil bidimensional de proteínas de <i>R. tropici</i> CIAT899 en medio B <sup>-</sup> , medio B <sup>-</sup> con apigenina y medio B <sup>-</sup> con NaCl 300 mM.....	- 198 -
<b>Figura R84.-</b> Perfil bidimensional de proteínas de <i>R. tropici</i> CIAT899 y del mutante C9 en medio B <sup>-</sup> con NaCl 300 mM .....	- 201 -

**DISCUSIÓN**

<b>Figura D1.-</b> Hipotético papel del gen <i>bgvA</i> en la ruta de regulación de la síntesis de factores Nod activada en <i>R. tropici</i> CIAT899 por el estrés salino .....	- 223 -
<b>Figura D2.-</b> Localización de las inserciones de Tn5-Mob y del interposón $\Omega$ en la secuencia del gen <i>bgvA</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899 .....	- 225 -

**ÍNDICE DE TABLAS****INTRODUCCIÓN**

<b>Tabla I1.-</b> Ejemplos de la especificidad en la nodulación de diferentes rizobios.....	- 6 -
<b>Tabla I2.-</b> Algunos inductores naturales presentes en exudados de raíz y semilla de <i>P. vulgaris</i> .....	- 14 -
<b>Tabla I3.-</b> Algunos genes de nodulación caracterizados.....	- 16 -
<b>Tabla I4.-</b> Proteínas implicadas en la regulación de la asimilación del amonio en los rizobios .....	- 38 -
<b>Tabla I5.-</b> Dominios funcionales de la proteína GlnD .....	- 41 -

**MATERIAL Y MÉTODOS**

<b>Tabla M1.-</b> Bacterias utilizadas en esta Tesis.....	- 55 -
<b>Tabla M2.-</b> Plásmidos utilizados en esta Tesis .....	- 58 -
<b>Tabla M3.-</b> Antibióticos utilizados en esta Tesis.....	- 61 -
<b>Tabla M4.-</b> Composición de las muestras empleadas en el marcaje de sondas con digoxigenina mediante PCR convencional .....	- 71 -
<b>Tabla M5.-</b> Cebadores para PCR convencional utilizados en esta Tesis .....	- 77 -
<b>Tabla M6.-</b> Cebadores para RT-PCR utilizados en esta Tesis .....	- 78 -
<b>Tabla M7.-</b> Marcador de amplio rango Protein Ladder (Invitrogen) usado para la determinación de las masas moleculares en los geles unidimensionales de proteínas .....	- 89 -
<b>Tabla M8.-</b> Programa de IEF seleccionado para separar las muestras de proteínas .....	- 91 -
<b>Tabla M9.-</b> Componentes de la mezcla liofilizada de proteínas Amersham LMW Calibration kit (GE Healthcare) usada para la determinación de la masa molecular relativa en geles bidimensionales en presencia de SDS.....	- 92 -
<b>Tabla M10.-</b> Patrones MALDI empleados a una concentración final de 750 pmol/L en los análisis por espectrometría de masas .....	- 94 -

**RESULTADOS**

<b>Tabla R1.-</b> Evolución del número de células viables, tiempo de generación y duración de la fase de latencia de <i>R. tropici</i> CIAT899 en medio TY y en medio TY con NaCl 100, 200 y 300 mM.....	- 108 -
<b>Tabla R2.-</b> Medidas de la D.O. a 600 nm y recuentos del número de células viables de <i>R. tropici</i> CIAT899 durante las primeras horas de crecimiento en medio TY y en medio TY con NaCl 300 mM.....	- 108 -
<b>Tabla R3.-</b> Análisis estructural de los factores Nod producidos por el mutante C8 en medio B <sup>-</sup> sin inductores .....	- 140 -
<b>Tabla R4.-</b> Análisis estructural de los factores Nod producidos por el mutante C8 en medio B <sup>-</sup> con apigenina .....	- 142 -

<b>Tabla R5.-</b> Análisis estructural de los factores Nod producidos por el mutante C8 en medio B <sup>-</sup> con NaCl 300 mM.....	- 143 -
<b>Tabla R6.-</b> Análisis estructural de los factores Nod producidos por <i>R. tropici</i> CIAT899 en medio B <sup>-</sup> con glutamina.....	- 145 -
<b>Tabla R7.-</b> Análisis estructural de los factores Nod producidos por <i>R. tropici</i> CIAT899 en medio B <sup>-</sup> con glutamina y apigenina .....	- 146 -
<b>Tabla R8.-</b> Análisis estructural de los factores Nod producidos por <i>R. tropici</i> CIAT899 en medio B <sup>-</sup> con glutamina y NaCl 300 mM.....	- 147 -
<b>Tabla R9.-</b> Análisis estructural de los factores Nod producidos por el mutante C8 en medio B <sup>-</sup> con glutamina.....	- 150 -
<b>Tabla R10.-</b> Análisis estructural de los factores Nod producidos por el mutante C8 en medio B <sup>-</sup> con glutamina y apigenina.....	- 150 -
<b>Tabla R11.-</b> Análisis estructural de los factores Nod producidos por el mutante C8 en medio B <sup>-</sup> con glutamina y NaCl 300 mM .....	- 151 -
<b>Tabla R12.-</b> Eficiencia de <i>R. tropici</i> CIAT899 y del mutante C8 en la nodulación de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa .....	- 164 -
<b>Tabla R13.-</b> Eficiencia de <i>R. tropici</i> CIAT899 y del mutante C8 en la nodulación de <i>L. leucocephala</i> .....	- 165 -
<b>Tabla R14.-</b> Efectos de la complementación del gen <i>glnD</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899 sobre la nodulación de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa .....	- 170 -
<b>Tabla R15.-</b> Análisis estructural de los factores Nod producidos por el mutante C9 en medio B <sup>-</sup> con apigenina.....	- 178 -
<b>Tabla R16.-</b> Análisis estructural de los factores Nod producidos por el mutante C9 en medio B <sup>-</sup> con apigenina y NaCl 300 mM.....	- 179 -
<b>Tabla R17.-</b> Eficiencia de <i>R. tropici</i> CIAT899 y del mutante C9 en la nodulación de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa .....	- 187 -
<b>Tabla R18.-</b> Eficiencia de <i>R. tropici</i> CIAT899 y del mutante C9 en la nodulación de <i>L. leucocephala</i> .....	- 187 -
<b>Tabla R19.-</b> Identificación utilizando MALDI-MS/MS y MASCOT de algunas proteínas de <i>R. tropici</i> CIAT899 expresadas diferencialmente o ausentes en medio B <sup>-</sup> con NaCl 300 mM respecto a medio B <sup>-</sup> .....	- 200 -
<b>Tabla R20.-</b> Identificación utilizando MALDI-MS/MS y MASCOT de algunas proteínas expresadas diferencialmente en el mutante C9 respecto a CIAT899 en medio B <sup>-</sup> con NaCl 300 mM.....	- 202 -

## DISCUSIÓN

<b>Tabla D1.-</b> Características estructurales de las familias de factores Nod producidas por <i>R. tropici</i> CIAT899 y el mutante C8 en medio B <sup>-</sup> con y sin glutamina en condiciones control, con apigenina y con NaCl 300 mM.....	- 213 -
<b>Tabla D2.-</b> Características estructurales de las familias de factores Nod producidas por <i>R. tropici</i> CIAT899 y el mutante C9 en medio B <sup>-</sup> en condiciones control, con apigenina, con NaCl 300 mM y con apigenina y NaCl 300 mM .....	- 220 -



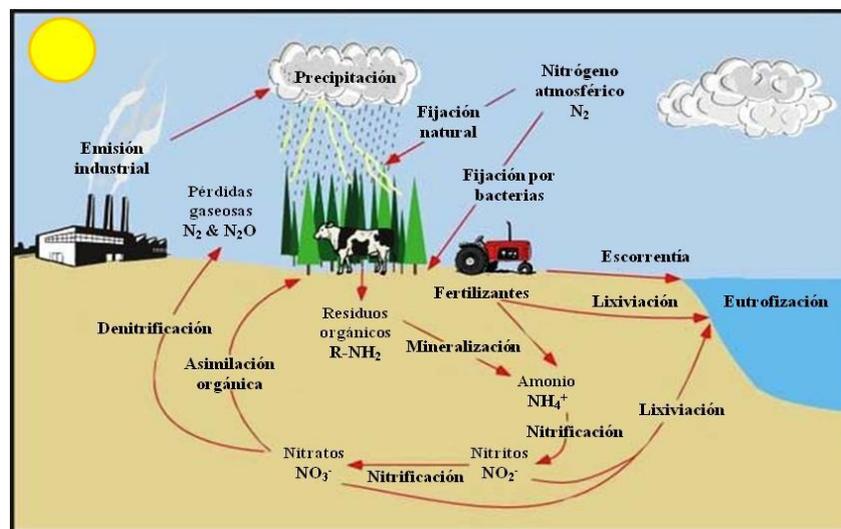
# *Introducción*

---



## 1. LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO.-

El nitrógeno forma parte de biomoléculas esenciales para el mantenimiento de vida en la biosfera como las proteínas y los ácidos nucleicos y, por término medio, representa el 6 % de la masa seca de los seres vivos (Cabello *et al.*, 2009). Su principal reservorio se encuentra en la atmósfera (79 % del volumen de la misma) en forma inaccesible para la mayor parte de los seres vivos como di-nitrógeno gaseoso ( $N_2$ ). También se encuentra, aunque en menor proporción, en la litosfera e hidrosfera formando parte de compuestos nitrogenados que no llegan a representar el 0,01 % del total. Una producción agrícola rica en proteínas de alta calidad depende fundamentalmente de la disponibilidad del nitrógeno (Ladha & Peoples, 1995). Las plantas superiores asimilan exclusivamente el nitrógeno combinado haciendo necesaria una conversión previa del nitrógeno atmosférico a nitrato  $NO_3^-$ , nitrito  $NO_2^-$  o amonio  $NH_4^+$  (Taiz & Zeiger, 1991). El proceso que media la entrada del nitrógeno a los ecosistemas se denomina “fijación del nitrógeno”, y se lleva a cabo mediante procesos industriales, naturales y biológicos (**Figura 11**).



**Figura 11.-** Ciclo del nitrógeno en la naturaleza.

Tradicionalmente se han abonado los suelos con nitratos para mejorar los rendimientos agrícolas. Durante muchos años se usaron productos naturales como el guano por sus altos niveles de nitrógeno y fósforo. Desde que se consiguió la síntesis artificial de amoníaco ( $NH_3$ ), mediante el proceso industrial denominado “reacción de Haber-Bosch”, fue posible fabricar abonos nitrogenados. Estos se emplean actualmente en grandes cantidades en la agricultura, y representan el 20 % de la cantidad total de nitrógeno fijado cada año (entre 200 y 250 millones de toneladas). Sin embargo, este

## Introducción

proceso tiene un elevado coste tanto económico como ecológico debido a su enorme potencial de contaminación ambiental. Además de la contaminación provocada durante el proceso de fabricación de los fertilizantes, una cantidad importante del fertilizante químico añadido al suelo acaba por lixiviación en las aguas subterráneas contaminando los acuíferos, o se transforma en óxido nitroso, gas que contribuye directamente al efecto invernadero. Por otra parte, la fijación del nitrógeno ocurre de forma natural en fenómenos como, por ejemplo, las tormentas. Sin embargo, estos procesos naturales sólo representan el 10 % de la cantidad total de nitrógeno fijado cada año. Por su parte, la fijación biológica del nitrógeno (FBN) es el proceso por el que el nitrógeno atmosférico es reducido desde su estado químicamente inerte ( $N_2$ ) hasta el compuesto asimilable amonio ( $NH_4^+$ ) por la enzima nitrogenasa (Peters & Szilagyi, 2006). Este proceso es inhibido por el oxígeno y sólo lo realizan organismos procariontes, denominados diazotrofos, que crean un ambiente microaerobio para realizar la fijación del nitrógeno bien en forma libre o estableciendo relaciones simbióticas con otros organismos (Raymond *et al.*, 2004). Los aportes de nitrógeno al suelo mediante la FBN constituyen casi el 70 % del total del nitrógeno fijado cada año.

De las relaciones simbióticas en las que ocurre la FBN, la asociación que establecen las leguminosas con el grupo bacteriano conocido como “rizobios” ha sido durante décadas la más significativa desde el punto de vista agrícola (Burdman *et al.*, 1998). Con ella se consiguen entre el 25 y el 35 % de las proteínas que se consumen a nivel mundial (Vance *et al.*, 2000). Su empleo en prácticas agrícolas, como la rotación de cultivos o el empleo de cultivos mixtos, permiten extender los beneficios de la fijación de nitrógeno a otras plantas que no sean leguminosas. De este modo se consiguen elevados aportes de nitrógeno en las cosechas (Zahran, 1999) que se traducen en una alta productividad a la vez que se reducen los impactos negativos causados por el uso excesivo de fertilizantes. En este sentido la FBN favorece el desarrollo de una agricultura sostenible, entendiendo como tal aquella que intenta conservar y manejar de manera más eficiente los recursos de los que dispone, manteniendo un ambiente favorable para la evolución de todas las especies (Vance, 1998). Además, la capacidad de las leguminosas de fijar nitrógeno en simbiosis con los rizobios confiere a dicha asociación un gran atractivo desde el punto de vista de la reforestación de tierras marginales y ecosistemas alterados, incluyendo los arrasados por el fuego (Arianoutsou & Thanos, 1996).

### 2. LA SIMBIOSIS DE LOS RIZOBIOS CON LAS LEGUMINOSAS.-

Los rizobios son un grupo polifilético de bacterias Gram-negativas del suelo que se caracterizan por inducir el desarrollo de órganos fijadores de nitrógeno, llamados nódulos, en las raíces o más raramente en los tallos de plantas hospedadoras específicas (Lloret & Martínez-Romero, 2005). Actualmente hay reconocidas unas 92 especies de rizobios si bien su número aumenta constantemente conforme se van caracterizando nuevos aislamientos. Estas especies se agrupan en 12 géneros, concretamente *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Devosia*, *Sinorhizobium* (sinónimo homotipo de *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium* y *Shinella* (Weir, 2011). Aunque tradicionalmente todos los rizobios se agruparon en una única familia, la *Rhizobiaceae* (Jordan, 1984), en la actualidad se encuentran organizados en seis (*Bradyrhizobiaceae*, *Burkholderiaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Phyllobacteriaceae* y *Rhizobiaceae*) distribuidas, a su vez, en los órdenes *Rhizobiales* y *Burkholderiales*, pertenecientes a las subdivisiones  $\alpha$  y  $\beta$  de las proteobacterias, respectivamente (Sawada *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2005).

A diferencia de otros fijadores de nitrógeno, el ciclo de vida de los rizobios incluye un estadio de vida libre en el que viven como bacterias heterótrofas aerobias en el suelo o en la rizosfera de las plantas, y un estadio endosimbiótico en el que viven como bacteroides fijando el nitrógeno atmosférico bajo las condiciones fisiológicas que se establecen en los nódulos. La asociación con las leguminosas beneficia directamente a las poblaciones de rizobios dentro de los nódulos al proporcionarles protección y fuentes de carbono para mantener su metabolismo, e indirectamente a las poblaciones de la rizosfera al suministrarles compuestos necesarios para su crecimiento a través de los exudados de las raíces (Walker *et al.*, 2003). Con la única excepción del género *Parasponia* (familia *Ulmaceae*), todas las plantas que establecen simbiosis con los rizobios son leguminosas (familia *Fabeceae*) (van Rhijn & Vanderleyden, 1995; Sprent, 2001). La asociación con los rizobios permite a las leguminosas colonizar con éxito hábitats deficientes en nitrógeno, donde otras plantas difícilmente crecen. Las leguminosas son mucho más ricas en proteínas que cualquier otra familia de plantas gracias a las copiosas cantidades de nitrógeno que obtienen de la relación simbiótica que establecen con los rizobios. Además, presentan un elevado porcentaje de carbohidratos solubles (50-70 %) y fibra (alrededor del 8 %) y un bajo contenido en

## Introducción

grasas (1-2 %). Igualmente cabe destacar su alto contenido en hierro y calcio (Duranti & Gius, 1997). Todo ello las convierte en eficaces instrumentos para la nutrición humana y animal, y en la mejora de la salud del suelo especialmente en los países en vías de desarrollo (Gray & Smith, 2005).

### 2.1. LA ESPECIFICIDAD DE LA RELACIÓN.-

El establecimiento de una simbiosis efectiva es un proceso altamente específico en función del rizobio y la leguminosa considerados. La promiscuidad simbiótica no está asociada con ningún grupo taxonómico en particular, sino que está ampliamente distribuida en la naturaleza (Perret *et al.*, 2000). Se conoce como “rango de hospedador” al conjunto de plantas en las que una especie de rizobio puede nodular de forma eficiente. Entre las distintas especies que habitan en la rizosfera ocurren eventos de transferencia horizontal de genes, entre ellos los simbióticos, lo que contribuye a estrechar evolutivamente el rango de hospedador y conseguir simbiosis sumamente específicas (Barcellos *et al.*, 2007). En la **Tabla II** se muestran algunas de las especies más características de rizobios y sus leguminosas hospedadoras.

**Tabla II.-** Ejemplos de la especificidad en la nodulación de diferentes rizobios (Willems, 2006).

Estirpe	Hospedador
<b>Azorhizobium</b>	
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i> y <i>S. punctata</i>
<b>Bradyrhizobium</b>	
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine, Macroptilium, Vigna</i>
<i>B. japonicum</i>	<i>Arachis, Glycine, Macroptilium, Vigna</i>
<b>Mesorhizobium</b>	
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. loti</i>	<i>Anthyllis, Leucaena, Lotus, Lupinus, Mimosa</i>
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza, Halimodendron, Sophora</i>
<b>Rhizobium</b>	
<i>R. etli</i>	<i>Leucaena, Phaseolus</i>
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Medicago, Trifolium</i>
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Pisum, Vicia</i>
<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum</i>
<i>R. tropici</i>	<i>Leucaena, Macroptilium, Phaseolus</i>
<b>Sinorhizobium</b>	
<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Sesbania, Trigonella</i>
<i>S. fredii</i>	<i>Cajanus, Glycine, Macroptilium, Vigna</i>
<i>S. saheli</i>	<i>Acacia, Sesbania</i>

### 2.2. ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS.-

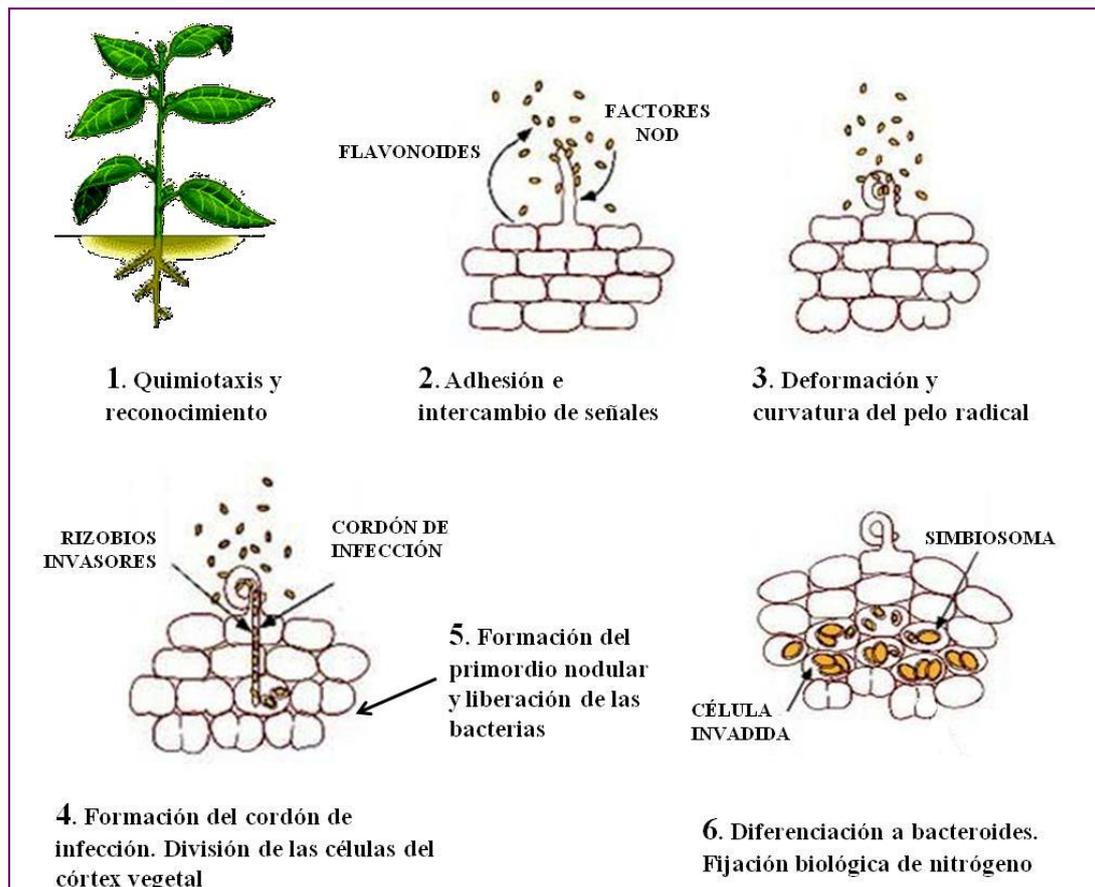
La simbiosis que un determinado rizobio establece con su hospedador específico es el resultado de un complejo proceso de intercambio de señales entre ambos (**Figura I2**). Todo el proceso está regido por la expresión coordinada y altamente regulada de genes tanto de la planta como de la bacteria, fruto de un incesante proceso de coevolución entre los simbioses (Olroyd & Downie, 2008).

La relación simbiótica comienza con el desarrollo de las poblaciones de rizobios en la rizosfera de las leguminosas (Patriarca *et al.*, 2004). Los distintos compuestos que la planta exuda a través de la raíz favorecen el desarrollo de un mayor número de microorganismos en la rizosfera que en el suelo circundante, donde los nutrientes son más limitantes para las bacterias. Este fenómeno se conoce con el nombre de “efecto rizosfera” (Bolton *et al.*, 1992). Entre el 10 y el 30 % de los fotosintatos de la planta son secretados en los exudados radicales en los que se incluyen carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas y compuestos aromáticos como los flavonoides (Sadowsky & Graham, 1998). Los rizobios en vida libre son atraídos de forma activa hacia la superficie radical por el efecto quimiotáctico de algunos de estos compuestos, entre ellos los flavonoides (Brencic & Winans, 2005).

A continuación tiene lugar la adhesión del rizobio a la superficie de pelos radicales en crecimiento, paso fundamental que precede a la colonización e invasión de la raíz. Entre los componentes de la superficie bacteriana que juegan un papel esencial en la interacción física con la célula vegetal se encuentran moléculas como los lipopolisacáridos (LPS), exopolisacáridos (EPS), glucanos cíclicos (GC) y los polisacáridos capsulares (KPS). Junto a ellos, unas proteínas extracelulares bacterianas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , denominadas ricadhesinas, y las lectinas de la planta median el contacto en función de las condiciones medioambientales. Así, en condiciones de alcalinidad las lectinas podrían liberarse de los pelos radicales, siendo las ricadhesinas bacterianas las responsables de la unión. En condiciones de acidez las ricadhesinas se liberan de la superficie bacteriana y las lectinas de la planta contribuyen en mayor grado a la unión (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007). El anclaje de los rizobios al pelo radical se ve reforzado por fibrillas de celulosa sintetizadas por la bacteria (Smit *et al.*, 1987), las cuales servirán como base para la formación de microcolonias y posteriores biopelículas en la superficie de la raíz, en las que el aporte de nutrientes a todas las células estará asegurado (Downie, 2010).

## Introducción

Simultáneamente a la adhesión de los rizobios a la raíz de la leguminosa se produce el reconocimiento molecular entre los simbios. Los flavonoides liberados por la planta inducen la expresión de los genes de nodulación (genes *nod*) en los rizobios. Estos genes están involucrados en la biosíntesis y secreción de los factores de nodulación (factores Nod). A su vez, la percepción de los factores Nod específicos por la célula vegetal induce una serie de cambios en las células de la epidermis y del córtex de la raíz de la planta, que culminarán con la formación de los nódulos.



**Figura 12.-** Etapas básicas del establecimiento de la simbiosis entre los rizobios y las leguminosas.

En las células epidérmicas, los factores Nod inducen una despolarización de la membrana plasmática, fluctuaciones en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y expresión de genes específicos, provocando una alteración del crecimiento polar de los pelos radicales. Las oscilaciones de calcio, conocidas como “calcio spiking”, disparan en la célula vegetal una cascada de señalización intracelular mediada por proteínas G. En consecuencia, la organización del citoesqueleto de actina, el control del tráfico de vesículas hacia la membrana plasmática y la regulación del crecimiento celular se ven afectados en la célula vegetal (Cárdenas *et al.*, 1998). Todo esto lleva a la deformación

del pelo radical, que se curva hasta 360° hacia el punto de su superficie en el que se detecta la mayor concentración de factores Nod (Esseling *et al.*, 2003). Así el pelo adquiere una forma característica conocida como “cayado de pastor” que engloba a los rizobios compatibles en un microambiente localizado (Geurts & Bisseling, 2002).

A continuación, se produce la entrada del rizobio en el pelo radical mediante una degradación localizada de la pared celular y la invaginación de la membrana plasmática de la célula vegetal. En el interior del pelo radical se produce un flujo coordinado de vesículas que van a depositar en ese lugar material como polisacáridos y quitina (pared celular secundaria) contribuyendo a la formación del cordón de infección. El cordón de infección es una estructura tubular que engloba a la bacteria y que crece hacia los tejidos internos de la raíz. En el interior del cordón de infección tiene lugar la división de los rizobios que inicialmente quedaron adheridos a la raíz y fueron atrapados por la curvatura del pelo. La formación del cordón de infección está dirigida por la planta aunque requiere la presencia de la bacteria, pues sin ella no se observa la aparición de verdaderos cordones de infección (Gage, 2004).

Simultáneamente a la formación del cordón de infección, se produce la reactivación del ciclo celular en las células del córtex de la raíz, que sufren sucesivas rondas de replicación mitótica (endoreduplicación) dando lugar a la aparición de los primordios nodulares. El cordón de infección avanza, penetrando entre las células vegetales, hacia el primordio recién desarrollado, donde se ramifica y comienza a extenderse. Cuando el extremo del cordón de infección, que carece de pared celular, alcanza el centro de un primordio nodular los rizobios se liberan al citoplasma de las células corticales mediante un proceso similar a la endocitosis. Las bacterias quedan entonces envueltas por una membrana de origen vegetal, denominada membrana peribacteroidea, en cuyo interior se van a diferenciar morfológica y fisiológicamente a bacteroides para fijar el nitrógeno atmosférico. De este modo, una única célula vegetal termina albergando a cientos de bacteroides en el interior de nuevos orgánulos fijadores de nitrógeno denominados simbiosomas (Roth *et al.*, 1988). Una vez maduros, los bacteroides dejan de dividirse y comienzan a fijar el nitrógeno atmosférico. Las dos membranas del simbiosoma (membrana citoplasmática del bacteroide y membrana peribacteroidea, de origen vegetal), además de constituir una barrera física, juegan un papel esencial en la regulación del intercambio molecular de carbono y nitrógeno que se establece entre ambos simbiosomas (Panter *et al.*, 2000). La sacarosa sintetizada

## Introducción

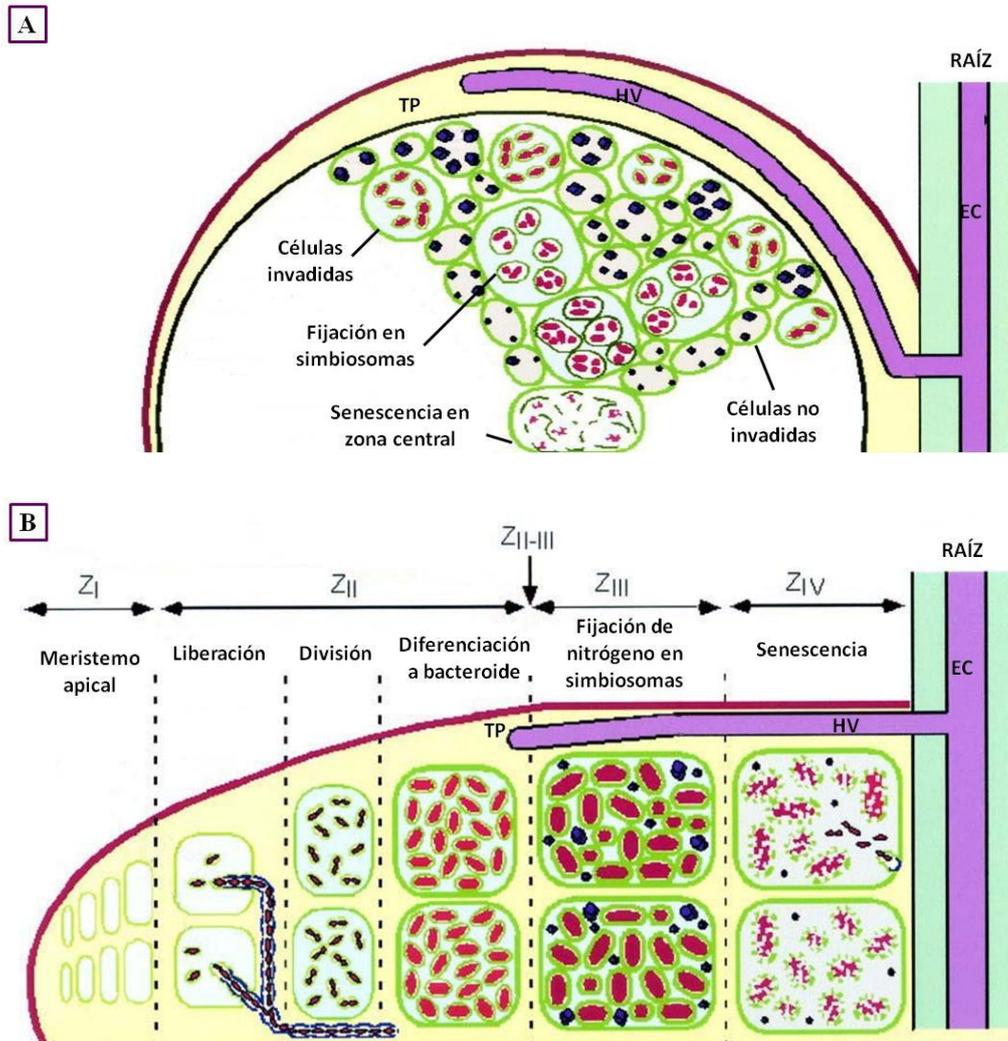
fotosintéticamente por la planta llega al nódulo por el floema y es convertida en ácidos dicarboxílicos, que serán usados por los bacteroides para generar el ATP y el poder reductor necesarios para fijar nitrógeno. El amoniaco formado en este proceso difunde al espacio peribacteroideo y, tras su protonación, el ión amonio es transportado a través de un canal iónico al citoplasma de la célula vegetal donde es asimilado por la ruta GS/GOGAT (glutamina sintetasa/glutamina-oxoglutarato aminotransferasa o glutamato sintasa). Finalmente, el nitrógeno fijado es transportado a través del xilema desde los nódulos al resto de la planta, en forma de amidas o ureidos, dependiendo de que los nódulos sean indeterminados o determinados, respectivamente (Udvardi & Day, 1997; Jones *et al.*, 2007).

### 2.3. TIPOS DE NÓDULOS.-

Dependiendo del lugar en el que se induzcan las divisiones mitóticas en la raíz, característica propia de cada planta, podemos encontrar dos tipos de nódulos: determinados e indeterminados (**Figura I3**).

En leguminosas de clima tropical, como *Glycine max* (soja) o *Phaseolus vulgaris* (judía), el primordio nodular se forma en el córtex externo dando lugar a nódulos determinados o esféricos, con un meristemo de actividad transitoria, por lo que todas las células del tejido central del nódulo presentan el mismo estado de desarrollo. El modo de crecimiento de este tipo de nódulos, basado en el aumento de tamaño de las células, les confiere su forma esférica (**panel A de la Figura I3**). En leguminosas de clima templado como *Medicago sativa* (alfalfa) o *Leucaena leucocephala* (leucena), el primordio nodular se forma en el córtex interno dando lugar a nódulos indeterminados o cilíndricos, con un meristemo apical persistente. La actividad continua del meristemo asegura el alargamiento del nódulo, ya que continuamente se generan células nuevas que van siendo infectadas. En una sección longitudinal de este tipo de nódulos se aprecian cuatro zonas (I-IV) con células, bacterias y bacteroides en diferentes etapas de diferenciación (**panel B de la Figura I3**).

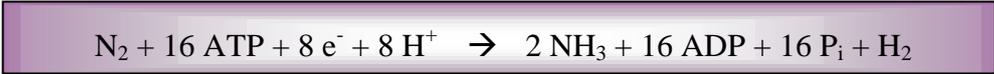
Aunque los bacteroides maduros una vez diferenciados no son capaces de dividirse, en el interior del nódulo siempre existe un reservorio de rizobios no diferenciados, fundamentalmente en las ramificaciones del cordón de infección, que tras la senescencia del nódulo pueden volver al suelo y colonizarlo (Kahn *et al.*, 1998; Timmers *et al.*, 2000).



**Figura I3.-** Tipos de nódulos. **Panel A:** nódulo determinado. **Panel B:** nódulo indeterminado en el que se detallan las siguientes zonas: **I.-** meristemo; **II.-** zona de invasión; **III.-** zona de fijación y **IV.-** zona de senescencia. EC: estela central, HV: haces vasculares y TP: tejido periférico (Patriarca *et al.*, 2002).

#### 2.4. LA FIJACIÓN DEL NITRÓGENO EN LOS NÓDULOS.-

El simbiosoma constituye la unidad básica fijadora de nitrógeno en el nódulo. En su interior los bacteroides reducen el nitrógeno atmosférico a amonio gracias a la acción del complejo enzimático de la nitrogenasa, que cataliza un proceso altamente energético que sigue la siguiente ecuación (Werner, 1992):



El complejo enzimático de la nitrogenasa está formado por dos proteínas, dinitrogenasa y nitrogenasa reductasa, cuya síntesis y actividad son extremadamente

## Introducción

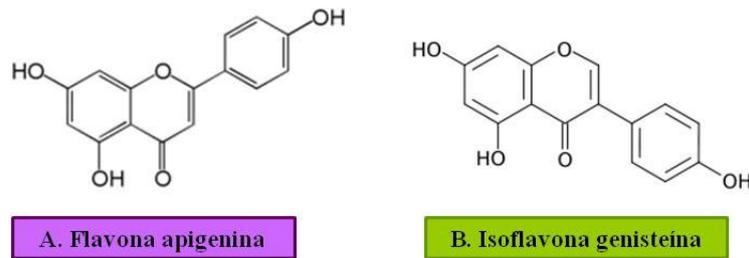
sensibles al oxígeno. Por esta razón existe un preciso mecanismo de control de la disponibilidad de oxígeno en el nódulo, de modo que éste llega a los bacteroides transportado por la leghemoglobina, en cuya síntesis están involucradas tanto la planta como la bacteria (Fischer, 1996; Kaminski *et al.*, 1998; Brewin, 2002). Además, la presencia de una barrera de difusión al oxígeno en la superficie del nódulo (parénquima) contribuye a la regulación de la concentración de este elemento en su interior.

### 3. SEÑALES MOLECULARES IMPLICADAS EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS.-

#### 3.1. LOS FLAVONOIDES.-

Los rizobios responden a una serie de compuestos orgánicos presentes en los exudados de las raíces y semillas de las plantas, induciéndose en ellos la transcripción de los genes de nodulación, requeridos para la formación del nódulo (Spaink, 2000). En función de su estructura estos compuestos inductores se clasifican en dos grupos: flavonoides y no flavonoides; que incluyen las betaínas y los ácidos aldónicos fundamentalmente. Todos ellos son productos del metabolismo secundario de las plantas, involucrados en las respuestas defensivas de las mismas y están ampliamente distribuidos en el reino vegetal.

Los flavonoides son los inductores de los genes de nodulación más potentes conocidos, pues actúan a concentraciones inferiores a  $10^{-6}$  M (Schlaman *et al.*, 1998). No obstante, la cantidad requerida para ejercer su acción puede variar en función del resto de los compuestos presentes en el exudado (Phillips, 1992). Los flavonoides son compuestos fenólicos que la planta sintetiza empleando la benzopirona como precursor. Constituyen un grupo químicamente muy diverso y biológicamente muy versátil que incluye flavonas, isoflavonas, flavanonas, cumarinas, chalconas, y antocianidinas (Harborne & Williams, 2001). Se han identificado unos 30 flavonoides inductores en 9 géneros de leguminosas (Cooper, 2004). Ninguno de los flavonoides conocidos hasta la fecha actúa como regulador transcripcional universal para todos los rizobios. Así, por ejemplo, la isoflavona genisteína induce la transcripción de los genes de nodulación en *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Hungria *et al.*, 1991a) pero no presenta actividad en *R. tropici* (Folch-Mallol *et al.*, 1998). Por otra parte, la flavona apigenina induce la transcripción de los genes de nodulación en *R. tropici* CIAT899 (Morón *et al.*, 2005) (**Figura I4**). Cuanto mayor sea el número de flavonoides reconocidos por un rizobio, mayor podrá ser, en principio, su rango de nodulación (Parniske & Downie, 2003).



**Figura I4.-** Estructura química de los flavonoides apigenina y genisteína.

Cada leguminosa secreta un conjunto específico de flavonoides y compuestos, cada uno de los cuales puede actuar como inductor, inhibidor o ser inefectivo en la activación de los genes de nodulación de una estirpe rizobiana en particular, siendo todos ellos responsables del efecto final sobre la misma (Perret *et al.*, 2000). La pauta de exudación en las leguminosas varía en función de las condiciones medioambientales, nutricionales y de desarrollo de las mismas (Phillips, 1992). En ciertas condiciones de estrés como el estrés hídrico o la limitación de nitrógeno se observa en *Medicago sativa* un incremento en la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de flavonoides (Schultze *et al.*, 1994). Se ha postulado que durante la evolución, los rizobios podrían haber empezado a utilizar este incremento en la producción de flavonoides como una señal para interactuar con la planta sometida a limitación de nitrógeno (Coronado *et al.*, 1995). Además, en presencia de rizobacterias e incluso de factores Nod purificados, se producen cambios en la pauta de exudación de las plantas. van Brussel *et al.* (1990) y Phillips *et al.* (1994), describieron que la presencia de determinados rizobios en las raíces de sus plantas hospedadoras ocasionaba un aumento en los niveles de la actividad inductora de sus exudados. Se ha especulado ampliamente sobre la similitud de este efecto y la respuesta que las plantas desarrollan frente al ataque de patógenos, donde los niveles de fitoalexinas se incrementan. El motivo es la existencia de precursores comunes de los compuestos inductores de los genes *nod* y las fitoalexinas, lo que hace presuponer que la simbiosis rizobio-planta haya podido evolucionar a partir de una relación patógena (Kluepfel, 1993).

Según Broughton *et al.* (2000), *P. vulgaris* es una de las leguminosas que secreta mayor cantidad y variedad de flavonoides, lo que podría explicar la capacidad de esta planta para establecer simbiosis con una amplia variedad de rizobios. En la **Tabla I2** se muestran algunos de los inductores naturales que forman parte de los exudados naturales de raíz y semilla de *P. vulgaris*.

## Introducción

**Tabla I2.-** Algunos inductores naturales presentes en exudados de raíz y semilla de *P. vulgaris*.

Fuente	Compuesto	Referencia	
Semilla	Antocianidinas	Delfinidina	Hungría <i>et al.</i> , 1991b
		Petunidina	Hungría <i>et al.</i> , 1991b
		Malvidina	Hungría <i>et al.</i> , 1991b
	Flavonas	Canferol	Hungría <i>et al.</i> , 1991b
		Quercetina	Hungría <i>et al.</i> , 1991b
		Miricetina	Hungría <i>et al.</i> , 1991b
Raíz	Chalconas	Isoliquiritigenina	Bolaños-Vásques & Werner, 1997
	Cumarinas	Cumestrol	Dakora <i>et al.</i> , 1993
	Isoflavonas	Genisteína	Hungría <i>et al.</i> , 1991b
		Daizeína	Dakora <i>et al.</i> , 1993
	Flavanonas	Eriodictiol	Hungría <i>et al.</i> , 1991b
		Naringenina	Hungría <i>et al.</i> , 1991b
		Liquiritigenina	Bolaños-Vásques & Werner, 1997

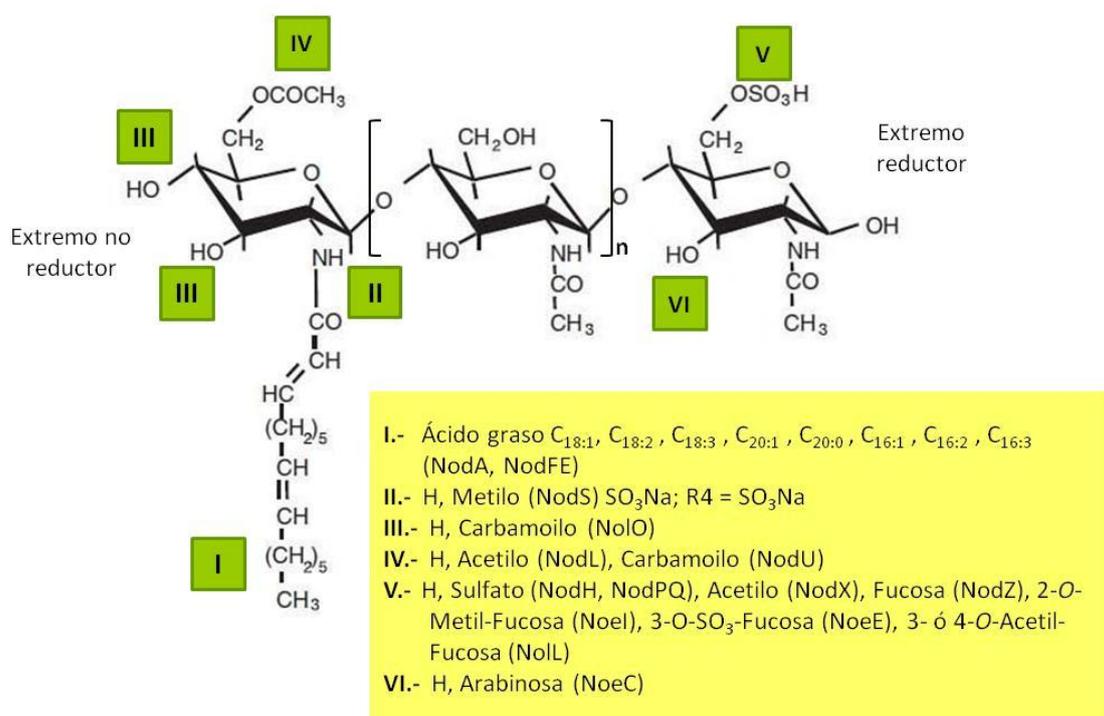
Además de su capacidad inductora de los genes de nodulación, los flavonoides intervienen en la coloración de flores, frutos, semillas y hojas, desempeñan un papel importante en la biosíntesis y transporte de las auxinas de las plantas, y actúan como fitoalexinas en la defensa de las plantas frente a patógenos (Dakora, 2003).

### 3.2. LOS FACTORES NOD.-

Los factores de nodulación o factores Nod son aminoazúcares producidos por los rizobios en respuesta a la señal liberada por la planta (flavonoides, betaínas y ácidos aldónicos) para iniciar el proceso de nodulación en dicho hospedador (Mergaert *et al.*, 1997). Todos los factores Nod caracterizados hasta la fecha tienen una estructura básica común consistente en un esqueleto oligomérico de 2 a 6 unidades de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) unidas por un enlace  $\beta$ -(1,4), que llevan unido un ácido graso al nitrógeno del extremo no reductor (Spaink, 2000). Debido a su semejanza estructural con la quitina, polímero  $\beta$ -1,4 de glucosamina típico de hongos y del exoesqueleto de los insectos, a los factores Nod también se les conoce como LCO (Lipo-Chitin Oligosaccharides). Esta estructura básica suele ir modificada por distintos radicales de naturaleza variable tanto en el extremo reductor como en el no reductor. Los grupos *N*-metilo, *O*-acetilo y *O*-carbamoilo son los que más comúnmente aparecen modificando el extremo no reductor de las moléculas. Los grupos fucosilo, 2-*O*-Me-fucosilo, 4-*O*-Ac-fucosilo, acetilo y sulfato son las sustituciones más frecuentes en el extremo reductor

(Broughton *et al.*, 2000; Perret *et al.*, 2000). La **Figura I5** muestra la estructura general básica de los factores Nod producidos por los rizobios así como sus radicales más comunes.

No obstante, existen ciertos factores Nod que difieren de la estructura comentada porque presentan otros tipos de esqueletos moleculares y/o sustituyentes. Así los factores Nod producidos por *S. fredii* USDA19 poseen un esqueleto pentamérico en los que el residuo de GlcNAc central es reemplazado por un grupo glucosilo (Bec-Ferté *et al.*, 1996). El grupo manosilo aparece excepcionalmente como sustituyente en el extremo reductor de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 (Folch-Mallol *et al.*, 1996). Los factores Nod producidos por *R. gallicum* bv. *gallicum* R592 también presentan diferencias respecto a la estructura general, ya que la glucosamina del extremo reductor está sustituida por un grupo glucosaminitol (Soria-Díaz *et al.*, 2006).



**Figura I5.-** Diversidad estructural de los factores Nod producidos por los rizobios. Los números I-VI indican las posiciones de unión de los radicales y *n* el grado de polimerización. Las enzimas que sintetizan o acoplan los sustituyentes más comunes se indican entre paréntesis (Downie, 2010).

### 3.2.1. LOS GENES DE NODULACIÓN.-

Los genes de la bacteria implicados en la producción de los factores Nod son los genes de nodulación. Inicialmente se denominaron como genes *nod*, pero la continua descripción de nuevos genes de nodulación en numerosas especies hizo necesario que se

## Introducción

usaran también las designaciones *nol* y *noe*. Estos genes se encuentran organizados en diferentes unidades transcripcionales en el genoma de la bacteria. En la mayoría de los rizobios se localizan en un plásmido de tamaño variado llamado plásmido simbiótico (pSym). Pero en algunas especies, como *B. japonicum* o *M. loti*, los genes de nodulación se agrupan en islas simbióticas en el cromosoma (Downie, 1998).

Los rizobios difieren en los genes de nodulación que presentan, y esta heterogeneidad es la responsable de las diversas estructuras de los factores Nod producidos (**Tabla I3**). Tradicionalmente los genes de nodulación se han clasificado según su función en dos grupos: comunes y específicos. Los genes de nodulación comunes (*nodA*, *nodB* y *nodC*) juegan un papel central en la síntesis del esqueleto de *N*-acetil-D-glucosamina y en la unión del ácido graso al extremo no reductor de la molécula. Los genes de nodulación específicos codifican las proteínas responsables de incorporar modificaciones en el esqueleto básico y cada rizobio sólo posee una parte de ellos. En esta categoría se incluyen muchos genes con distintas funciones que determinan el rango de hospedador de la estirpe portadora (Cárdenas *et al.*, 2003). Así, los productos de los genes *nodHPQ* están involucrados en la sulfatación del extremo reductor de los factores Nod de *R. tropici* (Folch-Mallol *et al.*, 1996), mientras que NodZ sintetiza y/o incorpora grupos fucosilo al esqueleto de los factores Nod de *S. fredii* HH103 (Lamrabet *et al.*, 1999).

**Tabla I3.-** Algunos genes de nodulación caracterizados (Perret *et al.*, 2000; Vance, 2002).

Gen	Función de la proteína que codifica
<i>nodA</i>	Aciltransferasa
<i>nodB</i>	Quitina desacetilasa
<i>nodC</i>	<i>N</i> -acetilglucosamina transferasa
<i>nodD</i>	Regulador transcripcional de otros genes de nodulación
<i>nodEF</i>	Síntesis de ácidos grasos poliinsaturados
<i>nodH</i>	Sulfotransferasa
<i>nodIJ, nodT</i>	Complejo de membrana responsable de la exportación del factor Nod
<i>nodL, nodX, nolL</i>	<i>O</i> -acetiltransferasa
<i>nodM</i>	Glucosamina sintasa
<i>nodPQ</i>	Síntesis de sulfato en forma activa
<i>nodS</i>	<i>N</i> -metiltransferasa
<i>nodU, nolO</i>	<i>O</i> -carbamoil transferasa
<i>nodZ</i>	Fucosil transferasa
<i>nolK</i>	Epimerasa implicada en la síntesis de fucosa
<i>nolR</i>	Represor de genes de nodulación

Numerosos estudios han permitido dilucidar la función y posición de las distintas proteínas en la ruta de biosíntesis de los factores Nod (**Figura I6**). El primer paso en la síntesis del esqueleto es llevado a cabo por la *N*-acetilglucosamina transferasa NodC. Esta proteína se localiza en la membrana citoplasmática y cataliza la unión de moléculas de *N*-acetilglucosamina previamente sintetizadas por la proteína NodM o por otras proteínas homólogas implicadas en el metabolismo general de la bacteria. La elongación de la cadena tiene lugar por el extremo no reductor. A continuación, la desacetilasa NodB elimina el residuo *N*-acetilo del extremo no reductor del oligosacárido y, finalmente, la aciltransferasa NodA transfiere un grupo acilo al grupo amino que ha quedado libre en dicha posición (Perret *et al.*, 2000). En un principio se pensó que estos tres genes eran funcionalmente intercambiables entre especies de rizobios sin que se alterasen las propiedades simbióticas de la bacteria receptora (Dénairé *et al.*, 1996), de ahí que recibieran el nombre de comunes. Sin embargo, ciertos estudios contradicen esta teoría y demuestran que NodA varía en su especificidad por diferentes ácidos grasos (Debellé *et al.*, 1996) mientras que NodC determina la longitud del esqueleto (Kamst *et al.*, 1995) contribuyendo así a la especificidad del rango de hospedador (Roche *et al.*, 1996).

Los factores Nod, una vez sintetizados y modificados, se secretan por la actividad de NodI, NodJ y NodT (Downie, 1998). Dicha secreción depende en parte de las condiciones ambientales como el pH o la temperatura, entre otros (MacKay & Djordjevic, 1993). Las proteínas NodI/NodJ/NodT presentan gran similitud con otros sistemas de secreción involucrados en el transporte de sustratos a través de la membrana citoplasmática, tales como los codificados por los genes *ndv*, implicados en la exportación de los glucanos cíclicos, o por los genes *kpsT/kpsM*, involucrados en la secreción del Kdo que contiene el antígeno capsular (Stanfield *et al.*, 1988; Whitfield & Valvano, 1993). La mutación de los genes *nod* implicados en la excreción de los factores Nod afecta sólo ligeramente a la nodulación, ya que su función puede ser realizada por otros genes incluso no simbióticos (Higgins *et al.*, 1990).

En respuesta a los exudados liberados por la planta, cada rizobio produce no sólo un factor Nod, sino mezclas que contienen desde 2 hasta incluso más de 60 moléculas de factores Nod diferentes que actúan de forma cooperativa para inducir la respuesta adecuada en la planta hospedadora (Minami *et al.*, 1996). La naturaleza de los radicales incorporados junto con el tipo de ácido graso presente en el extremo no reductor y la



longitud del esqueleto oligosacárido determinan la variabilidad de factores Nod producidos por cada rizobio y son los mayores determinantes de la especificidad bacteriana en el proceso de nodulación (D'Haese & Holsters, 2002). Un ejemplo bien estudiado de una modificación que determina el rango de hospedador es el grupo sulfato de los factores Nod de *S. meliloti*, pues mutantes que sintetizan factores Nod sin este radical ya no son capaces de nodular alfalfa (Schultze *et al.*, 1992), del mismo modo que la eliminación del grupo fucosilo en *S. fredii* disminuye el rango de hospedador de dicha estirpe (Lamrabort *et al.*, 1999).

### 3.2.1.1. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE NODULACIÓN.-

#### 3.2.1.1.1. EL GEN REGULADOR *nodD*.-

La expresión de la mayoría de los genes de nodulación requiere la presencia de flavonoides y su unión en la membrana interna a una proteína denominada NodD que actúa como sensor de las señales liberadas por la planta (Schell, 1993). La proteína NodD es un regulador transcripcional de la familia LysR que se transcribe constitutivamente en los rizobios y posee diferente especificidad por los flavonoides u otros compuestos derivados, dependiendo de la especie que la produzca (Broughton *et al.*, 2000). Los flavonoides secretados por las raíces de las leguminosas inducen cambios conformacionales en la proteína NodD, que le permiten unirse como multímero a motivos de ADN de 49 pb altamente conservados en las regiones promotoras de los genes *nod*, denominadas cajas de nodulación ó cajas *nod*, activando o reprimiendo así el proceso de expresión génica. La caja *nod* contiene una estructura palindrómica imperfecta (ATC-N<sub>9</sub>-GAT) que es el sitio de unión de la proteína NodD activada por los flavonoides (Fisher *et al.*, 1988; Schlaman *et al.*, 1992). En algunas bacterias como *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *S. meliloti* la proteína NodD se une a las cajas *nod* incluso en ausencia de inductores, si bien la activación se potencia en su presencia (Hong *et al.*, 1987).

El gen *nodD* está presente en todos los géneros rizobianos estudiados hasta la fecha (Schlaman *et al.*, 2006). Normalmente se localiza en el plásmido simbiótico, bien en una sola copia como en *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *A. caulinodans*, o en más de una copia como en numerosas especies, que han desarrollado respuestas específicas frente a diferentes grupos de flavonoides (Sousa *et al.*, 1993). Se especula que la divergencia de los genes *nodD* en los rizobios puede constituir un proceso evolutivo

## Introducción

para adaptar la estructura de los factores Nod e interactuar con múltiples hospedadores que secreten flavonoides distintos (Demont *et al.*, 1994). En *S. meliloti* es necesario mutar las tres copias del gen *nodD* para suprimir la nodulación (Honma & Ausubel, 1987; Honma *et al.*, 1990), mientras que en *Rhizobium* sp. NGR234 basta con mutar una de las dos copias que posee para suprimir la nodulación (Relic *et al.*, 1994). En *S. fredii* se han descrito dos copias de *nodD*, aunque sólo *nodD1* está implicado en la activación de la expresión de los genes de nodulación y se autoregula negativamente (Vinardell *et al.*, 2004). En *R. tropici* CIAT899 se han descrito cinco copias del gen *nodD* (van Rhijn *et al.*, 1993), de las cuales *nodD1* es imprescindible para la nodulación en *L. leucocephala* y *M. atropurpureum* ya que su mutación impide la nodulación en estas plantas, reduciéndose además significativamente la nodulación en *P. vulgaris* (van Rhijn *et al.*, 1994).

Parece claro que NodD controla, junto a los exudados de la planta, qué plantas van a ser noduladas por la bacteria ya que, transfiriendo el gen *nodD1* de *Rhizobium* sp. NGR234 a especies de estrecho rango de nodulación como *R. leguminosarum* bv. trifolii, se consigue extender su capacidad simbiótica hasta incluso a la no leguminosa *Parasponia andersonii* (Bassam *et al.*, 1988; Bender *et al.*, 1988). Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo exacto de cómo NodD responde al inductor para iniciar la transcripción de los genes *nod*. En *R. leguminosarum* bv. viciae la proteína NodD se sitúa en la membrana citoplasmática para facilitar su unión a los flavonoides. En cambio, en *S. meliloti* gran parte de la proteína se localiza en el citosol pero migra hacia la membrana donde parece tener lugar el contacto con el flavonoide (Kondorosi *et al.*, 1989). Igualmente en *S. meliloti* se ha descrito la presencia de unas proteínas de tipo chaperonas, homólogas a la proteína GroEL de *E. coli*, necesarias para la activación de la transcripción dependiente de NodD, lo que sugiere la participación de dichas proteínas en la traslocación hacia la membrana y su almacenamiento bajo una conformación soluble (Long *et al.*, 1991). También se ha sugerido que el complejo flavonoide-NodD se forma en la caja *nod*. Aunque la existencia de este complejo aún no se ha demostrado existen evidencias indirectas que indican que ambas moléculas interactúan (Peck *et al.*, 2006). Al igual que ocurre con los flavonoides, en ocasiones, la proteína NodD puede también actuar como represor de la expresión de los genes *nod* (Rossen *et al.*, 1985; Spaink *et al.*, 1989). En concreto se ha descrito que el gen *nodD2* de *Rhizobium* sp. NGR234, *B. japonicum* y *S. fredii* carece de la clásica caja *nod* y actúa

como un represor de los genes *nod* pudiendo estar implicado también en la producción del exopolisacárido. Los distintos mutantes en este gen presentan un incremento en la cantidad de factores Nod de hasta cinco veces superior a la sintetizada por la estirpe silvestre (Fellay *et al.*, 1998; Machado & Krishnan, 2003).

### 3.2.1.1.2. OTROS GENES REGULADORES.-

Además de NodD, en ciertas especies de rizobios existen otras proteínas implicadas en la regulación conjunta de la transcripción de los genes de nodulación. Frecuentemente estas proteínas también forman parte del proceso de síntesis de los polisacáridos extracelulares (Etzler *et al.*, 1999). La proteína SyrM, que también pertenece a la familia LysR de reguladores transcripcionales, regula la producción de factores Nod aparentemente en respuesta a señales diferentes a las observadas con la proteína NodD1 (Barnett *et al.*, 1998). En *S.meliloti*, SyrM activa la expresión del gen *nodD3* y éste activa recíprocamente la expresión del gen *syrM* que, si está en multicopia, consigue activar los genes de nodulación en ausencia de flavonoides (Kondorosi *et al.*, 1991). Además en esta estirpe, SyrM también controla la síntesis de exopolisacáridos mediante la regulación de la expresión del gen *syrA* (Barnett & Long, 1990). Los genes *syrM* y *nodD3* están involucrados en el control de los genes *nod* en coordinación con el sistema regulador *ntr* en función de los niveles de amonio, primer producto de la fijación de nitrógeno. Este mecanismo de regulación podría explicar el conocido efecto represor que ejerce el exceso de nitrógeno en la nodulación (Dusha & Kondorosi, 1993). En *Rhizobium* sp. NGR234, *syrM* se localiza en el plásmido simbiótico y presenta dos copias. SyrM1 puede necesitar otros reguladores para su actuación, como ocurre en *S. meliloti*, mientras que SyrM2 está bajo el control de cajas *nod* y se induce por flavonoides (Hanin *et al.*, 1998).

Existen otras proteínas Nod implicadas en la regulación de la producción de los factores Nod. Así, en el género *Bradyrhizobium* NodV y NodW, pertenecientes al grupo de sistemas reguladores de dos componentes, reconocen al isoflavonoide genisteína y son esenciales para la nodulación en *Macroptilium atropurpureum*, en *Vigna radiata* y en *V. unguiculata* (Loh *et al.*, 1997). NodV se localiza en la membrana y funciona como una quinasa sensora, que fosforila a NodW, activador de los genes de nodulación. NodW junto a NodD1 aumentan la inducción en los genes comunes, aunque se desconoce el mecanismo exacto de inducción. Además de su participación en el control positivo de algunos genes *nod*, no se descarta la posibilidad de que NodW esté

## Introducción

involucrada en la modificación de señales de la planta implicadas en la activación de la proteína NodD (Sanjuán *et al.*, 1994).

Por otra parte, la expresión de los genes de nodulación también está sujeta a un control negativo. Después de la inducción inicial por los flavonoides, se requiere una represión de varios de estos genes para conseguir una nodulación óptima. En los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium* se ha identificado el gen represor *nolR*, que se localiza en el cromosoma (Kiss *et al.*, 1998). Su activación y, por ello, la represión de varios genes de nodulación es necesaria para una óptima nodulación de *S. meliloti* en *M. sativa* (Kondorosi *et al.*, 1989) y de *R. leguminosarum* bv. *viciae* TOM en *Pisum sativum* cv. Wisconsin Perfection (Kiss *et al.*, 1998). Se ha descrito que, al igual que en *S. meliloti*, en *S. fredii* HH103 la proteína NolR se une a secuencias diana en las regiones promotoras de los genes *nodD1*, *nodD2* y *nodABC* y reprime su transcripción (Vinardell *et al.*, 2002).

En el género *Bradyrhizobium* se ha identificado el gen represor *nolA* que carece de la típica caja *nod* y requiere la presencia del gen *nodD2* para ejercer su función represora (García *et al.*, 1996). Se postula que su modo de acción ocurre a través de la inhibición de las señales de nodulación (Schlaman *et al.*, 1998).

Igualmente se han descrito fenómenos de regulación de la producción de factores Nod a nivel postranscripcional, como es el caso de NodX, proteína encargada de acetilar el esqueleto de glucosamina en la posición R4 y cuya actividad es dependiente de la temperatura de crecimiento de la bacteria (Olsthoorn *et al.*, 2000). Poco se conoce acerca de la regulación del proceso de síntesis de los factores Nod en el suelo o en la planta tras los pasos iniciales del proceso de infección. Aunque se ha demostrado que los genes *nod* esenciales en la síntesis de los factores Nod son reprimidos en etapas tardías de la simbiosis (Schlaman *et al.*, 1991), no existe información esclarecedora acerca de los mecanismos implicados en este proceso de regulación negativa.

### 3.2.2. PERCEPCIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS FACTORES NOD.-

Los factores Nod actúan en las células de la raíz de las leguminosas a concentraciones muy bajas (nano, pico y femtomolar) induciendo en ellas una serie de cambios fisiológicos y morfológicos que facilitan la entrada de los rizobios compatibles (D'Haese & Holsters, 2002). La simple adición de factores Nod purificados induce el

desarrollo en las raíces de las leguminosas de unas estructuras similares a los nódulos, denominadas pseudonódulos, que no están ocupados por los rizobios. El mecanismo de reconocimiento de los factores Nod por parte de la planta contiene aún muchas lagunas, aunque numerosos trabajos comienzan a elucidar su funcionamiento (Gleason *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2008). Se está aceptando ampliamente la teoría de la existencia de dos tipos de receptores de factores Nod en la membrana de las células epidérmicas de la raíz, ambos con actividad quinasa en su dominio intracelular (RLK, Receptor-Like Kinase). El primer tipo de receptores simbióticos posee dominios extracelulares ricos en lisina (LysR) a los que se unen los factores Nod. Son receptores altamente específicos y esenciales para la deformación del pelo radical. El segundo tipo de receptores posee dominios extracelulares ricos en leucina (LRR) y se localizan en la membrana plasmática y en la membrana del cordón de infección. Son receptores menos restrictivos pero importantes para iniciar los procesos posteriores de infección y desarrollo nodular (Riely *et al.*, 2004; Geurts *et al.*, 2005). Se considera que la activación de los receptores LysR es requisito necesario para la activación de los receptores LRR, si bien se desconocen los mecanismos exactos de cómo ambos receptores integran las señales recibidas. Algunos trabajos sugieren que la existencia de lectinas en la superficie de la célula vegetal podría influir en el reconocimiento de los factores Nod actuando en conjunción con los receptores de éstos (Hirsch, 1992).

La naturaleza de los sustituyentes de los factores Nod influye en la conformación tridimensional que adoptan finalmente estas moléculas, lo que resulta esencial para que sean reconocidos por los receptores de la planta y realicen su función (Broughton *et al.*, 2000). Algunos sustituyentes parecen desempeñar un papel de protección de los factores Nod frente a la degradación por las quitinasas liberadas por la planta lo que aumenta su estabilidad, particularmente en la rizosfera (D'Haese & Holsters, 2002). La presencia de un ácido graso saturado o monoinsaturado C<sub>18:1</sub> y de un grupo metilo en el nitrógeno del extremo no reductor del esqueleto oligosacárido son características comunes entre los factores Nod sintetizados por los rizobios que nodulan judía (*R. etli*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* y *R. tropici*) y es suficiente para inducir el reordenamiento del citoesqueleto de actina y la curvatura de los pelos radicales en *P. vulgaris*. La ausencia del grupo metilo en el nitrógeno del extremo no reductor de los factores Nod no elimina la capacidad de

## Introducción

inducir la curvatura del pelo radical, aunque sí retarda este efecto (Cárdenas *et al.*, 2003).

Una de las acciones más inmediatas que desencadenan los factores Nod en las células de la epidermis de la raíz es un cambio en el flujo de iones a través de la membrana (Downie & Walker, 1999). Aproximadamente al minuto del contacto de los factores Nod con la raíz, se produce una rápida entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  al interior del pelo radical acompañada de una salida de iones  $\text{Cl}^-$ . Esto provoca la despolarización de la membrana del pelo radical. Para reequilibrar las cargas y que tenga lugar la repolarización de la membrana, se produce la salida de iones  $\text{K}^+$  y la activación de la bomba de  $\text{H}^+$  (Felle *et al.*, 1998). Simultáneamente se produce una alcalinización intra- y extracelular, cuya duración en el tiempo indicará la vía funcional adoptada por la planta frente a este fenómeno. Si la alcalinización es duradera, se desarrollará la respuesta defensiva de la planta frente a un posible patógeno; mientras que si es transitoria se iniciará el proceso simbiótico (Ehrhardt *et al.*, 1992).

Otro de los efectos desencadenados por el contacto de la raíz con los factores Nod son unas oscilaciones rápidas de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en la punta y proximidades del núcleo del pelo radical (Wais *et al.*, 2000). Estas oscilaciones, conocidas como “calcio spiking”, se observan aproximadamente a los 10 minutos tras la aplicación de los factores Nod y pueden mantenerse hasta tres horas (Ehrhardt *et al.*, 1996). Las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  disparan en la célula vegetal una cascada de señalización mediada por proteínas G implicadas en numerosas respuestas de la planta, como, por ejemplo, la reorganización del citoesqueleto de actina y la regulación del crecimiento celular (Cárdenas *et al.*, 1998). A diferencia de los procesos anteriores de cambio en el flujo de iones y despolarización de la membrana, donde la adición del esqueleto de quitina induce efectos similares a los provocados por los factores Nod (Felle *et al.*, 2000), la fluctuación en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior de las células epidérmicas es muy específica desde el punto de vista estructural. En judía, por ejemplo, estos cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  sólo se producen tras la adición del factor Nod y no en presencia del oligómero de quitina (Cárdenas *et al.*, 1999).

Una de las últimas respuestas que la planta desarrolla frente a los factores Nod es la expresión en las células de la epidermis y del córtex de la raíz de unos genes específicos de los primeros estadios del proceso simbiótico, de ahí que las proteínas que codifican se denominen nodulinas tempranas (ENOD) (Esseling & Emons, 2004). Para

que se produzca la inducción de estos genes tempranos es necesaria la presencia de una mezcla de factores Nod, lo que podría explicar que los rizobios sinteticen mezclas de factores Nod estructuralmente distintos (Minami *et al.*, 1996). Asimismo, los factores Nod inducen divisiones celulares locales en el córtex de la raíz que conducen a la formación del primordio nodular. La inducción de estas divisiones depende fundamentalmente de la presencia del ácido graso en el factor Nod, siendo decisivas tanto la longitud como el número y posición de los dobles enlaces en los mismos (Demont-Caulet *et al.*, 1999).

### 3.3. LOS POLISACÁRIDOS SUPERFICIALES.-

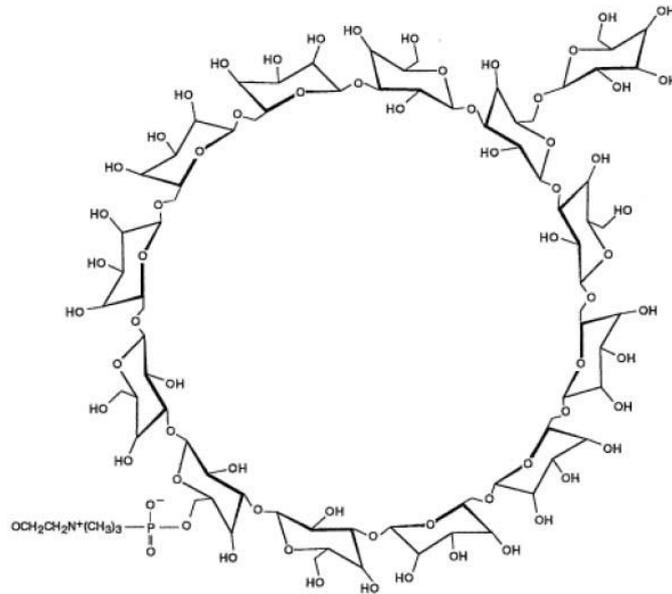
Además de los factores Nod, los rizobios producen compuestos polisacáridos que actúan protegiendo a las bacterias frente a las condiciones ambientales y frente a las respuestas defensivas de la planta y, de forma similar a los factores Nod, también actúan como señales durante el proceso de nodulación contribuyendo a su especificidad (D'Haese & Holsters, 2004; Jones *et al.*, 2007; Gibson *et al.*, 2008). *Rhizobium* produce cuatro tipos principales de polisacáridos superficiales (SPS): los  $\beta$ -glucanos cíclicos (CG), exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPS) y polisacáridos capsulares tipo antígeno K (KPS) (Gage, 2004; Corzo Varillas *et al.*, 2006). Mutantes de *Rhizobium* defectivos en SPS, o bien son incapaces de invadir la planta o bien, aunque lo hacen, son defectivos en la fijación de nitrógeno. En general, los EPS, KPS y CG parecen ser esenciales en las etapas tempranas de la infección, mientras que los LPS son importantes en etapas más tardías de la interacción (Frayssse *et al.*, 2003). A pesar de su importancia en la simbiosis, aún no se conoce con exactitud el papel que desempeña cada una de estas moléculas.

#### 3.3.1. LOS $\beta$ -GLUCANOS CÍCLICOS.-

Los  $\beta$ -glucanos cíclicos son polímeros circulares de entre 15 y 40 residuos de D-glucosa unidos por enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1,2). El género *Bradyrhizobium* constituye una excepción pues produce  $\beta$ -glucanos cíclicos ramificados con enlaces  $\beta$ -(1,3) y enlaces  $\beta$ -(1,6) (**Figura I7**). En ocasiones las características químicas de los  $\beta$ -glucanos se ven modificadas por la existencia de una o más sustituciones no sacarídicas como fosfocolina, fosfoglicerol, ácido succínico y ácido metilmalónico (Spaink, 2000; Frayssse *et al.*, 2003). Los glucanos cíclicos se localizan y acumulan mayoritariamente en el espacio periplásmico. No obstante, en según qué especies y dependiendo del

## Introducción

estado de crecimiento y las condiciones de cultivo, los  $\beta$ -glucanos cíclicos pueden ser secretados al medio extracelular a través de un sistema de secreción de tipo ABC.



**Figura I7.-** Estructura química de los glucanos cíclicos  $\beta$ -(1,3) -  $\beta$ -(1,6) de *B. japonicum* (Spaink, 2000).

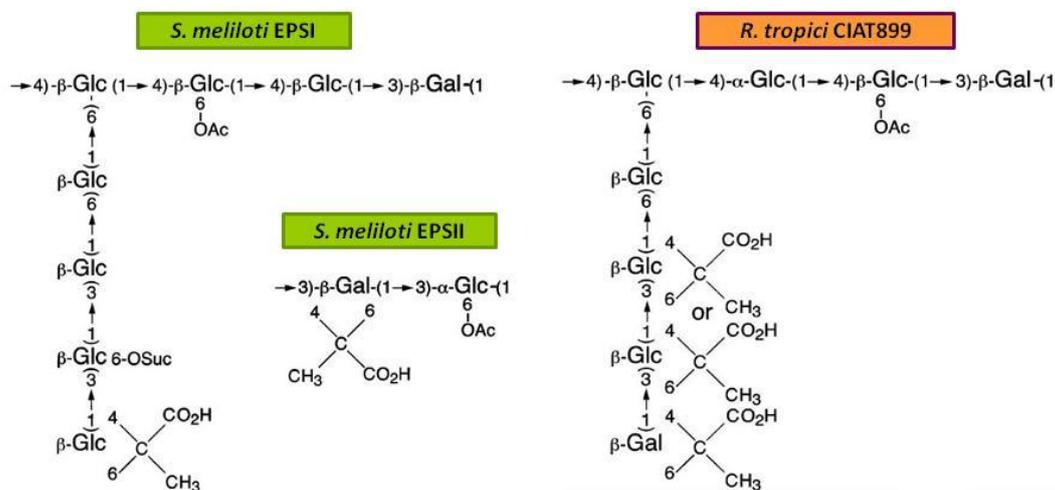
El hecho de que en vida libre los mutantes afectados en la síntesis de glucanos cíclicos presenten problemas de crecimiento en medios hipoosmóticos, indica que estas moléculas podrían estar implicadas en la osmoprotección de los rizobios, facilitando su rápida adaptación a las distintas condiciones osmóticas con las que deben enfrentarse durante su interacción con las leguminosas (Frayse *et al.*, 2003). Además, los glucanos cíclicos desempeñan un papel importante como supresores específicos de la respuesta defensiva de la planta actuando como escudo protector de la bacteria (Mithöfer, 2002). También pueden actuar como moléculas transportadoras de señales entre los rizobios y los tejidos vegetales al unirse a moléculas hidrofóbicas como los flavonoides y los factores Nod (Spaink, 2000; Fraysse *et al.*, 2003).

### 3.3.2. LOS EXOPOLISACÁRIDOS.-

Los exopolisacáridos son secretados en grandes cantidades por los rizobios y se unen débilmente a la superficie celular. Son grandes heteropolímeros constituidos por una unidad oligosacáridica repetitiva con múltiples sustituciones. Los azúcares más frecuentes son D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-ramnosa y los ácidos D-glucurónico y D-galacturónico. Las sustituciones más comunes son los grupos piruvilo, acetilo,

succinilo e hidroxibutanoilo. Los EPS se acumulan en la superficie bacteriana constituyendo una barrera física de protección frente a los agentes externos, y contribuyen a la adhesión, a la adquisición de nutrientes y a las propiedades antigénicas de las bacterias (Spaink, 2000). Además, los oligosacáridos que derivan del EPS pueden actuar como moléculas señal en procesos de comunicación intercelular (Frayse *et al.*, 2003).

La biosíntesis de EPS y su regulación ha sido estudiada en detalle en *S. meliloti* (Skorupska *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2007). Esta estirpe produce dos tipos de EPS: el succinoglucano o EPS I y el galactoglucano o EPS II (**Figura I8**).



**Figura I8.-** Estructura química de las unidades repetitivas presentes en los dos tipos de exopolisacáridos (EPSI y EPSII) de *S. meliloti* y del exopolisacárido de *R. tropici* CIAT899. (Downie, 2010). Glc: glucosa, Gal: galactosa, Ac: acetato, Suc: succinato.

Para ambos tipos de EPS se encuentran, a su vez, dos especies de alto y bajo peso molecular según el número de unidades repetitivas que los compongan, aunque la forma de bajo peso molecular del succinoglucano parece ser la simbióticamente activa (Pellock *et al.*, 2000; Lepek & D'Antuono, 2005). Hasta el momento se han descrito 22 genes implicados en la biosíntesis del succinoglucano. Los genes *exo* y *exp* se localizan agrupados en el megaplásmido pSymB. Además, existen algunos genes localizados en el cromosoma como los genes reguladores *exoR*, *exoS* y *mucR* (Spaink, 2000; Kaufusi *et al.*, 2004). Se han descrito otros reguladores de la producción de EPS I como *syra*, que a su vez está regulado por el sistema general de regulación del nitrógeno en la célula *ntr*, y *cbrA*, que coordina múltiples aspectos de la fisiología bacteriana implicados en la invasión del nódulo y en la diferenciación a bacteroide (Skorupska *et al.*, 2006; Gibson *et al.*, 2007). La agrupación génica *exp* es la responsable de la

## Introducción

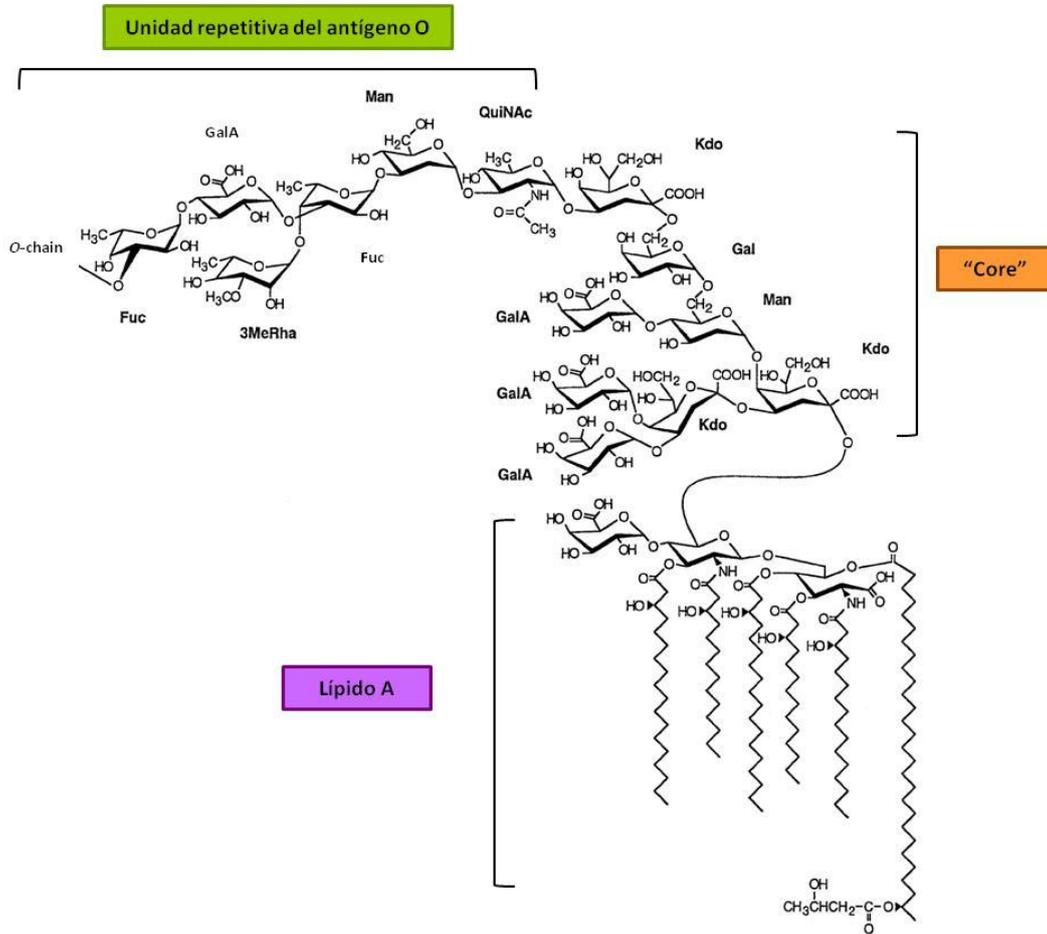
biosíntesis del galactoglucano, cuya producción también está influenciada por *mucR* y *expR*, homólogo a *luxR*, y por tanto es dependiente de un sistema de percepción de quórum (Pellock *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista simbiótico, el EPS desempeña un papel esencial en las primeras etapas del establecimiento de la relación, especialmente en aquellas asociaciones en las que se forman nódulos de tipo indeterminado (Pellock *et al.*, 2000; Fraysse *et al.*, 2003). En estos casos, los mutantes deficientes en la producción de EPS no nodulan o forman nódulos vacíos, carentes de bacterias, que presentan cordones de infección abortados. La adición de EPS de bajo peso molecular revierte este fenotipo, lo que sugiere que el EPS podría funcionar como molécula de señalización en estos casos y que, al igual que los factores Nod, deben ser reconocidos por los correspondientes receptores en la planta, aún no identificados (Kereszt *et al.*, 1998). Sin embargo, en las asociaciones en las que se forman nódulos de tipo determinado, los mutantes en el EPS no están afectados en la simbiosis o sólo lo están ligeramente (Bortakur *et al.*, 1986). Una de las funciones atribuidas al EPS es la reorganización del citoesqueleto del pelo radical influenciando de esta manera la extensión del cordón de infección (Pellock *et al.*, 2000). Trabajos más recientes sugieren que el EPS desempeña un papel primario en la supresión de las respuestas de defensa de la planta ante la invasión bacteriana (Jones *et al.*, 2008). Algunos autores como Staehelin *et al.* (2006) han propuesto que la molécula simbióticamente activa no es el EPS sino un exo-oligosacárido que se forma por tras su degradación por la endo- $\beta$ -1,4-glicanasa codificada por el gen *exoK*.

### 3.3.3. LOS LIPOPOLISACÁRIDOS.-

Los lipopolisacáridos son complejas moléculas glicolipídicas que se localizan en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Están formadas por tres partes: el lípido A, la región central, core u oligosacárido interno y el antígeno O (**Figura I9**). El lípido A sirve de anclaje a la membrana y está normalmente constituido por un disacárido de glucosamina que presenta entre 4 y 6 ácidos grasos  $\alpha$ -hidroxilados. La región central o core es un oligosacárido unido mediante enlaces glucosídicos al lípido A y al antígeno O. Está constituido por diversos azúcares y derivados, entre los que se encuentra una molécula poco frecuente denominada Kdo (ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico). Finalmente, el antígeno O constituye la parte más externa del LPS. Es un polisacárido constituido por desoxi y/o didesoxi-azúcares y cuya composición es muy

variable de una estirpe de rizobio a otra contribuyendo a las propiedades antigénicas de la bacteria (Raetz & Whitfield, 2002; Fraysse *et al.*, 2003).



**Figura I9.-** Estructura química del lipopolisacárido de *R. etli* CE3 (Spaink, 2000). Fuc: fucosa, GalA: ácido galacturónico, Gal: galactosa, Man: manosa, Me: metilo, Rha: ramnosa, QuiNAc: *N*-acetil-quinovosamina, Kdo: ácido 3- desoxi-D-mano-2-octulosónico.

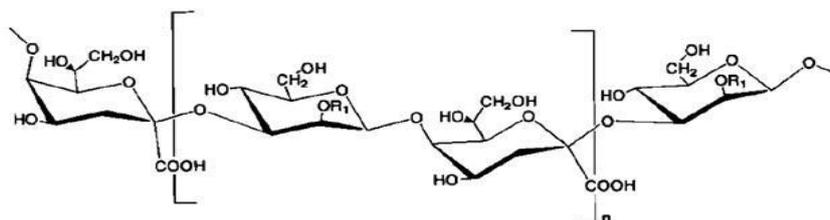
En vida libre, los LPS contribuyen a la estabilización de la membrana y actúan como barrera frente a compuestos antibacterianos como los péptidos catiónicos. Desde el punto de vista simbiótico, los LPS están involucrados fundamentalmente en las etapas más tardías del proceso de infección desempeñando un papel crítico en la adaptación y persistencia del rizobio en el simbiosoma. La estructura del LPS varía en respuesta a las señales externas y está regulada diferencialmente durante la simbiosis (Spaink, 2000). La planta induce modificaciones en la estructura de los LPS de los rizobios a través de los flavonoides (Broughton *et al.*, 2006) e incluso durante la diferenciación a bacteroide, cuyos LPS muestran mayor hidrofobicidad que en vida libre (Kannenberg & Carlson, 2001). Estas variaciones en las propiedades del LPS podrían explicar que la mayor parte de los mutantes con defectos en el LPS en vida libre, conserven la capacidad de inducir la formación de nódulos. En ocasiones, la falta de LPS impide la simbiosis en algunos

## Introducción

hospedadores pero no en otros (Niehaus *et al.*, 1998; Ormeño-Orrillo *et al.*, 2008). En otros trabajos se sugiere que las moléculas de LPS suprimen respuestas de defensa de la planta como la producción de especies reactivas de oxígeno (Frayse *et al.*, 2003; Scheidle *et al.*, 2005).

### 3.3.4. LOS POLISACÁRIDOS CAPSULARES.-

Los polisacáridos capsulares son un tipo de exopolisacáridos que permanecen unidos a la membrana externa de los rizobios formando una matriz hidratada que protege a la célula frente a la desecación y confiere resistencia a los bacteriófagos (Frayse *et al.*, 2003). Los primeros polisacáridos capsulares se identificaron en *S. meliloti*, contenían Kdo (ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico) y eran estructuralmente análogos al grupo II de antígenos K de *Escherichia coli* (Reuhs *et al.*, 1993). Por ello, se denominaron polisacáridos tipo antígeno K ó KPS. La estructura de los KPS varía y es específica de cada estirpe (Kannenberg *et al.*, 1998). Dentro de esta variabilidad, el motivo estructural que los define consiste en una pequeña unidad repetitiva formada por hexosas y Kdo u otros 1-carboxi-2-ceto-3-desoxiazúcares (Reuhs *et al.*, 1998) (**Figura I10**).



**Figura I10.-** Estructura química de la unidad polisacáridica repetitiva ( $n$ ) del KPS de *S. fredii* USDA257 (Forsberg & Reuhs, 1997).

Diversos estudios indican que los KPS desempeñan un papel en la nodulación (Petrovics *et al.*, 1993). En ausencia de succinoglucano y galactoglucano, el KPS permite la nodulación de *S. meliloti* en plantas de alfalfa, aunque los cordones de infección en estos casos abortan tempranamente (Pellock *et al.*, 2000). Mutantes de *S. fredii* en los genes *rkpH* y *rkpG*, incapaces de producir KPS, muestran una nodulación muy reducida independientemente de si se produce o no EPS (Parada *et al.*, 2006). En *Rhizobium* sp. NGR234 la adición de flavonoides inhibe la síntesis del KPS y activa la de un LPS rico en ramnosa que es simbióticamente activo. Estos estudios indican que el conjunto de los polisacáridos de superficie varía enormemente a lo largo del desarrollo

simbiótico, y refuerza la idea de que contribuyen al establecimiento de la relación (le Queré *et al.*, 2006).

### 3.4. LAS PROTEÍNAS EXTRACELULARES.-

Los rizobios secretan diversas proteínas al espacio periplásmico y al medio extracelular que pueden influir en la simbiosis y en las respuestas defensivas de la planta. Los sistemas de transporte existentes en los rizobios se agrupan en dos grandes clases dependiendo del mecanismo que se utilice para el transporte a través de la membrana plasmática. Los sistemas Sec-dependientes se encuentran en todas las bacterias Gram-negativas y son los que se utilizan para la traslocación de proteínas hacia el periplasma. Las proteínas secretadas a través de esta vía poseen un característico péptido señal en su extremo *N*-terminal que posteriormente se rompe mediante peptidasas. La energía necesaria para este transporte se obtiene gracias a una ATPasa. Los sistemas de transporte Sec-independientes permiten el transporte de sustratos directamente desde el citosol al exterior celular sin necesidad de que exista un intermediario periplásmico ni péptido señal en el extremo *N*-terminal (Thanassi & Hultgren, 2000). En función de la naturaleza molecular de la maquinaria de transporte y de las reacciones que catalizan, las vías de secreción de las bacterias Gram-negativas se clasifican en sistemas de tipo I, II, III, IV, V o autotransporte y de tipo VI (Krehenbrink & Downie, 2008).

El sistema de secreción de tipo I es una vía Sec-independiente por la que se secretan gran variedad de toxinas, proteasas y lipasas que influyen en la adhesión a la planta hospedadora (Koronakis *et al.*, 2004). El sistema de secreción de tipo II es un sistema Sec-dependiente por el que se secretan gran variedad de enzimas hidrolíticas y toxinas. El transporte tiene lugar en dos pasos. Primero la maquinaria trasloca el sustrato al periplasma. Allí la proteína pierde el péptido señal y adquiere su conformación nativa para ser traslocada al medio extracelular a través de un complejo multiproteico que se extiende a través de las membranas interna y externa (Lee & Schneewind, 2001).

El sistema de secreción de tipo III deriva del sistema flagelar de los rizobios y permite inyectar proteínas directamente desde el citoplasma bacteriano al interior de las células hospedadoras a través de las dos membranas bacterianas y de la membrana celular eucariótica (Saier, 2004). Este sistema de secreción se asocia con la

## Introducción

patogenicidad de muchas bacterias (Cornelis & van Gijsegem, 2000). Está formado por unas 20 proteínas, algunas de las cuales actúan en el citoplasma, otras forman un canal que atraviesa las membranas bacterianas y otras forman una estructura en forma de jeringa que inyecta las proteínas efectoras, denominadas Nops (nodulation outer protein), en la célula eucaritota. No todos los rizobios poseen sistema de secreción de tipo III, pero cuando está presente desempeña un papel importante en la simbiosis (Deakin & Broughton, 2009). La síntesis de la maquinaria de secreción y de las proteínas efectoras está regulada por los flavonoides y por NodD, lo que refuerza el papel que este sistema puede desempeñar en la simbiosis (Wassem *et al.*, 2008).

El sistema de secreción de tipo IV se utiliza para secretar tanto proteínas como ácidos nucleicos, siendo el sistema *tra* para la transferencia de plásmidos entre bacterias uno de los mejor caracterizados. Esta vía es la usada por *Agrobacterium tumefaciens* para transferir el ADN-T y nucleoproteínas al citoplasma de la célula vegetal (Christie, 2004). Las proteínas que los rizobios secretan por esta vía están a menudo involucradas en la degradación de las proteínas del hospedador (Hubber *et al.*, 2007).

Las proteínas secretadas mediante el sistema de secreción de tipo V atraviesan la envoltura bacteriana de forma autónoma, por lo que este sistema también se denomina autotransporte. En primer lugar las proteínas atraviesan la membrana interna mediante el sistema Sec. Una vez en el periplasma, el dominio C-terminal de la proteína forma un poro en la membrana externa que cataliza la translocación del dominio N-terminal al medio extracelular (Henderson *et al.*, 2004). Se conoce poco la influencia de estas proteínas en la relación simbiótica.

Más recientemente se ha descrito en los rizobios un sistema de secreción de tipo VI que trasloca proteínas homólogas a proteínas que unen ribosa y constituye un factor de virulencia clave en bacterias patógenas como *Vibrio cholerae*. El sistema está compuesto por unas 20 proteínas cuyos genes, denominados *imp*, se hayan ampliamente conservados en bacterias Gram-negativas (Bingle *et al.*, 2008).

### 3.5. LAS MOLÉCULAS IMPLICADAS EN LA PERCEPCIÓN DEL QUÓRUM.-

Muchas bacterias regulan la expresión de numerosos genes en relación a su densidad de población mediante pequeñas moléculas difusibles denominadas autoinductores. En bacterias Gram-negativas estas moléculas son mayoritariamente del tipo N-acil-homoserina lactonas (AHL), compuestos caracterizados por presentar un

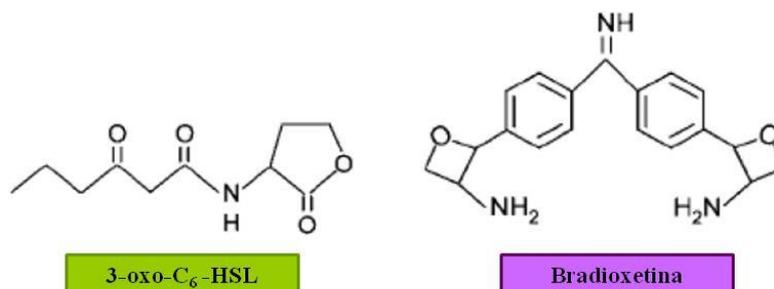
anillo de homoserina conservado con un grupo acilo de longitud variable. Cada célula de una población bacteriana sintetiza AHL que salen al medio por difusión de forma que a medida que la población crece, la concentración de AHL en el medio extracelular va aumentando. Cuando la concentración de AHL en el medio extracelular alcanza un valor umbral, las moléculas de AHL penetran en el interior de las bacterias donde son detectadas por reguladores transcripcionales de la familia LuxR. Estos son los responsables de inducir la expresión de diversos genes, entre ellos el que codifica la AHL sintasa, originando un bucle de retroalimentación positiva. Este tipo de regulación dependiente del quórum se conoce como “quorum sensing” (QS) y es particularmente importante en la infección de plantas por bacterias fitopatógenas (von Bodman *et al.*, 2003). El QS ha demostrado ser crucial en la coordinación de los rizobios que van a establecer simbiosis con su hospedador (Daniels *et al.*, 2002). Las AHL rizobianas regulan diversos procesos de la fisiología de estas bacterias como la transferencia de plásmidos (genes *traR/traI*), la eficiencia de nodulación (genes *rhiR/rhiI*), la producción de los polisacáridos de superficie EPS II (genes *sinR/sinI*), o la inhibición del crecimiento y el desarrollo del simbiosoma (genes *cinR/cinI* y genes *raiR/raiI*) (González & Marketon, 2003). El gen *expR* tiene un papel complicado de descifrar pero está relacionado con la movilidad, quimiotaxis y expresión de genes del flagelo bacteriano contribuyendo a la regulación de diversos cambios importantes para la simbiosis (Downie, 2010).

En *Bradyrhizobium japonicum* se ha identificado un sistema de regulación dependiente del quórum mediado por bradioxetina que se activa principalmente en condiciones limitantes de hierro. La bradioxetina tiene una estructura similar al antibiótico oxetina y a ciertos sideróforos (**Figura I11**). A pesar de no tener estructura de AHL, en condiciones de alta densidad celular induce la expresión del gen *nolA*. Este último reprime la expresión de los genes de nodulación probablemente vía *nodD2*, lo que resulta esencial para la nodulación de algunas variedades de soja (Loh *et al.*, 2002a, 2002b; Jitackorn & Sadowsky, 2008).

Es probable que la planta hospedadora ejerza cierta influencia en la expresión de los genes rizobianos regulados por mecanismos de percepción del quórum. Numerosas plantas como el guisante, el tomate y el arroz pueden interferir en la comunicación por QS de las bacterias que interaccionan con ellas, al detectar moléculas del tipo AHL y/o producir metabolitos, de estructura no completamente definida, que antagonizan e

## Introducción

incluso mimetizan su función (AHL *mimics*) (Gao *et al.*, 2003; Sánchez-Contreras, 2007). Pérez-Montaña *et al.* (2011) han demostrado que en *Sinorhizobium fredii* SMH12, *Rhizobium etli* ISP42 y *Rhizobium sultae* IS123 la producción de AHL se incrementa en presencia de los flavonoides inductores de los genes de nodulación. Otros trabajos sugieren que la secreción de este tipo de moléculas por las plantas es inducida por la presencia de los microorganismos (Bauer & Teplitski, 2001).



**Figura I11.-** Estructura de autoinductores presentes en *Rhizobium* (Soto *et al.*, 2006).

#### 4. FACTORES ABIÓTICOS QUE AFECTAN A LA SIMBIOSIS DE LOS RIZOBIOS CON LAS LEGUMINOSAS. LA SALINIDAD.-

El establecimiento de una simbiosis efectiva está determinado por el estado fisiológico tanto de la bacteria como de la leguminosa hospedadora. Son muchos los factores medioambientales que pueden limitar el crecimiento de los cultivos y, por ello, la actividad fijadora de nitrógeno en las leguminosas, entre ellos el estrés abiótico por salinidad, temperaturas o pH extremos, o la disponibilidad de nitrógeno en el suelo.

Entre las condiciones adversas de los sistemas agrícolas, la salinidad es el factor que más ha influido sobre el establecimiento de las poblaciones humanas. Las tierras afectadas por el estrés salino se distribuyen prácticamente por todas las regiones climáticas y convierte a los suelos agrícolas en improductivos, lo que determina que la salinidad sea una de las mayores restricciones para la producción de alimentos (Zahran, 1999; Zhu, 2001). En la actualidad más del 20% de los suelos cultivados y aproximadamente el 50% de las tierras irrigadas, están catalogados como potencialmente salinos, gran parte de ellos en la cuenca mediterránea (Singh & Chatrath, 2001).

La sal común (NaCl) es un compuesto inorgánico que ejerce sobre las células un estrés tanto iónico como osmótico, debido a la fuerza iónica que origina en toda solución acuosa y a su alta capacidad de retención de agua. Ante esta situación las

plantas desarrollan respuestas defensivas que no siempre son suficientes para superar esta condición adversa. De hecho, el efecto más común de la salinidad sobre las plantas es la reducción del desarrollo debido a una disminución del potencial osmótico del medio, una toxicidad específica normalmente asociada con la absorción excesiva de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Cl}^-$ , un desequilibrio nutricional debido a la interferencia de los iones salinos con los nutrientes esenciales, y la combinación de los efectos antes indicados. Como consecuencia de estos efectos primarios, a menudo ocurren otros secundarios, como el estrés oxidativo. Las leguminosas son plantas poco tolerantes a la sal según la clasificación de Greenway & Munns (1980), si bien existe cierta variabilidad entre las distintas especies. Así *Phaseolus vulgaris*, *Vicia faba*, y *Glycine max* son más tolerantes a la sal que *Pisum sativum*. Existen muchos factores, tales como las condiciones climáticas, las propiedades del suelo y el cultivar seleccionado que limitan la habilidad de las distintas leguminosas para crecer en condiciones salinas (Cordovilla *et al.*, 1995).

Por su parte, los rizobios suelen ser más tolerantes que sus hospedadores, aunque también muestran una marcada diversidad en cuanto a su tolerancia frente al estrés salino (Miller & Wood, 1996). Como patrón general, las bacterias de crecimiento rápido suelen ser más tolerantes a la sal que las de crecimiento lento, si bien existen numerosas excepciones (El-Sheikh & Wood, 1990). Yelton *et al.* (1983) informaron acerca de ciertas estirpes de rizobios cuyo crecimiento disminuía significativamente bajo concentraciones de NaCl superiores a 100 mM, mientras que Priefer *et al.* (2001) aislaron rizobios de nódulos de *P. vulgaris* en Marruecos que toleraban concentraciones de NaCl de hasta 680 mM. El rango de tolerancia a la sal de una estirpe bacteriana viene determinado por su capacidad de respuesta frente al estrés salino. En este sentido, existe un primer grupo de bacterias altamente tolerantes a la sal, que incrementan su concentración salina interna hasta igualarla con la del exterior (familia *Halobacteriaceae*), y un segundo grupo más numeroso que contrarresta la subida de la concentración salina externa con la síntesis de moléculas de bajo peso molecular, denominadas solutos compatibles, que ajustarán el valor de la presión osmótica interna sin que afecte a la fisiología celular (Brown & Simpson, 1972).

Ciertos estudios indican que las leguminosas que están en simbiosis con los rizobios son más susceptibles al estrés abiótico que aquellas que crecen con nitrógeno mineral (Hungria & Vargas, 2000). Esto es debido no sólo a la influencia de los factores ambientales sobre la planta hospedadora y la población de rizobios, sino también sobre

## Introducción

la propia interacción simbiótica. El estrés salino puede actuar indirectamente en la simbiosis de las leguminosas con los rizobios reduciendo el crecimiento del hospedador, alterando la estructura de los pelos radicales y afectando a determinados procesos fisiológicos de la planta como la germinación, la fotosíntesis y determinadas actividades enzimáticas (Zhu, 2001). Por otra parte, la salinidad puede afectar directamente al proceso de infección del rizobio durante los primeros pasos del inicio del desarrollo del nódulo. Tu (1981) observó que los pelos radicales de plantas de soja no mostraban ningún tipo de deformación cuando eran inoculadas con *B. japonicum* en presencia de NaCl 170 mM, y que la nodulación se inhibía por completo con NaCl 210 mM. La salinidad también produce una reducción en la tasa de fijación de nitrógeno, bien por una disminución en el número o en el tamaño de los nódulos (Bekki *et al.*, 1987; Craig *et al.*, 1991), una bajada en los niveles de leghemoglobina de los mismos que determine una menor tasa respiratoria (Delgado *et al.*, 1994) o por una disminución de la actividad nitrogenasa (Tejera *et al.*, 2004). Se ha demostrado que para hacer frente a esta situación, una vez establecida la asociación los bacteroides integran sus respuestas osmoadaptativas con las de la planta asimilando sustancias osmoprotectoras que éstas sintetizan (Fougère & Le Rudulier, 1990). Además, se ha descrito que, bajo estrés salino, las plantas exudan moléculas osmoprotectoras como la trigonellina, betaína que actúa como inductora de los genes de nodulación en ciertos rizobios (Phillips *et al.*, 1992). Bajo estas condiciones el éxito de la simbiosis está claramente condicionado por la elección conjunta y adecuada de un simbionte y un hospedador compatibles, ambos tolerantes a la sal (Zahran, 1991). En este sentido se están desarrollando numerosas estrategias encaminadas a la obtención de cultivares transgénicos más tolerantes a la sal, cuya asociación con estirpes bacterianas también tolerantes permitan mejorar la productividad en condiciones adversas (Drevon *et al.*, 2001; Yamaguchi & Blumwald, 2005).

### 5. REGULACIÓN DEL METABOLISMO DEL NITRÓGENO EN LOS RIZOBIOS.-

El amonio es el único compuesto nitrogenado inorgánico que se puede incorporar a los esqueletos carbonados, de ahí que sea la fuente de nitrógeno con la que muchas bacterias consiguen mayores tasas de crecimiento. Sin embargo, los ambientes naturales ofrecen fuentes alternativas de nitrógeno combinado como nitratos, aminoácidos, aminoazúcares o nucleósidos, que las bacterias también pueden aprovechar (Merrick & Edwards, 1995). Las bases del conocimiento sobre el

metabolismo del nitrógeno en las bacterias se establecieron en enterobacterias y actualmente se extienden a muchos otros grupos bacterianos. La vía principal de asimilación del amonio implica la activación del transportador de amonio AmtB y de la glutamina sintetasa (GS), que incorpora el amonio al glutamato en presencia de cationes divalentes ( $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ ) y ATP generando glutamina. Este aminoácido constituye la primera fuente de nitrógeno orgánico para la biosíntesis de otros aminoácidos y compuestos nitrogenados necesarios para el funcionamiento celular (Cabello *et al.*, 2009).

La asimilación del amonio en las enterobacterias ocurre a través de la ruta GS/GOGAT (glutamina sintetasa/glutamina-oxoglutarato aminotransferasa) y, con elevadas concentraciones de amonio, a través de la ruta GDH (glutamato deshidrogenasa) (Reitzer, 1996). En los rizobios la ruta GDH parece estar ausente en tanto que se han identificado dos isoformas de la GS codificadas por los genes *glnA* (GSI) y *glnII* (GSII). La GSI es homóloga a la GS de *E. coli* y la forma predominante en procariotas, que se emplea fundamentalmente para la asimilación del amonio externo (Colonna-Romano *et al.*, 1987), mientras que la GSII es similar a la GS de eucariotas y se emplea fundamentalmente para la asimilación del amonio interno cuando es producido en bajas concentraciones (Darrow & Knotts, 1977). En *R. leguminosarum* y *R. meliloti* se ha identificado la GSIII, codificada por el gen *glnT*, que no se expresa cuando las otras dos isoformas están presentes (Chiurazzi *et al.*, 1992). Ninguna de las tres isoenzimas juega un papel esencial en la simbiosis (Schlüter *et al.*, 2000).

La síntesis y actividad de la GSI están reguladas de forma transcripcional y post-transcripcional mediante el sistema global de regulación del nitrógeno *ntr* que modula el metabolismo de este elemento en respuesta a las fuentes de nitrógeno disponibles y a las necesidades de la célula. Aunque existen diferencias en los mecanismos de regulación dependiendo del organismo, se considera que los componentes funcionales básicos del sistema *ntr* son la proteína GlnD, las proteínas triméricas P<sub>II</sub>, y el sistema regulador de dos componentes NtrB/NtrC (Arcondeguy *et al.*, 2001). En la **Tabla I4** se muestran las diferentes proteínas implicadas en el metabolismo de los compuestos nitrogenados en los rizobios.

El rizobio en vida libre asimila compuestos nitrogenados mayoritariamente en forma de amonio. Sin embargo, en simbiosis el metabolismo de asimilación del nitrógeno sufre un cambio que conduce a la fijación del nitrógeno atmosférico y a la

## Introducción

producción de un exceso de amonio que se exporta en beneficio de la planta (Merrick & Edwards, 1995). La diferenciación del rizobio a bacteroide implica la inducción de los genes de fijación *nif/fix* por mediación del regulador central del proceso de fijación de nitrógeno, NifA, en respuesta a la baja concentración de O<sub>2</sub> conseguida en el interior del nódulo. Los genes *nif* y *fix* se encuentran bien conservados en todos los organismos fijadores de nitrógeno y comprenden los genes encargados de codificar los polipéptidos de la nitrogenasa, los genes requeridos para la síntesis e incorporación de los cofactores de ésta, genes con funciones específicas necesarias para la vida en simbiosis y los genes reguladores de todo el proceso (Fischer, 1996).

**Tabla I4.-** Proteínas implicadas en la regulación de la asimilación del amonio en los rizobios.

Gen	Proteína	Función
<i>glnA</i>	GSI	Glutamina sintetasa (asimilación del NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> externo fundamentalmente)
<i>glnII</i>	GSII	Glutamina sintetasa (asimilación del NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> interno fundamentalmente)
<i>glnT</i>	GSII	Glutamina sintetasa (sólo presente en algunas especies de rizobios)
<i>glnE</i>	GlnE	Adeniltransferasa (ATasa)
<i>amtB</i>	AmtB	Transportador de amonio
<i>glnK</i>	GlnK (P <sub>II</sub> )	Regulador de AmtB
<i>glnB</i>	GlnB (P <sub>II</sub> )	Regulador de GlnE y NtrB
<i>glnD</i>	GlnD	Uridiltransferasa (UTasa/UR) de proteínas P <sub>II</sub>
<i>ntrB</i>	NtrB	Proteína quinasa modulada por P <sub>II</sub>
<i>ntrC</i>	NtrC	Regulador transcripcional dependiente de $\sigma^{54}$

La bacteria fijadora de nitrógeno *Klebsiella pneumoniae* sigue siendo el organismo modelo para el estudio de la regulación de los genes *nif* (Edwards & Merrick, 1995). El sistema regulador de dos componentes NtrB-NtrC controla la expresión del operón *nifLA* en respuesta a los niveles de nitrógeno fijado. Los productos de *nifLA* controlan el resto de los operones *nif/fix* en respuesta al oxígeno y al nitrógeno. NifL y NifA muestran ciertas homologías con NtrB y NtrC, respectivamente, y parecen constituir también un sistema de dos componentes en el que NifL es la proteína que detecta el estado metabólico de la célula en cuanto a la relación carbono/nitrógeno e inactiva a NifA cuando esa relación es baja. Tanto NtrC como NifA son factores transcripcionales dependientes del factor  $\sigma^{54}$  codificado por el gen *rpoN* (o *ntrA* o *glnF*) (Hunt & Magasanik, 1985), pero hay ciertas diferencias en cuanto al mecanismo de actuación de NtrB y NifL. Así, mientras NtrB se requiere tanto para la activación como

para la inactivación de NtrC, NifL sólo se requiere para la inactivación de NifA. Además, el sistema *ntr* no interviene en la represión de los genes *nif* por oxígeno; parece ser que es NifL quien detecta la presencia del oxígeno inactivando a NifA. En *S. meliloti* y *B. japonicum* el sistema *ntr* parece influir en el establecimiento de la relación simbiótica pero no desempeña un papel esencial durante la fijación del nitrógeno en estas bacterias (Szeto *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 1988). Dusha & Kondorosi (1993) demostraron que NtrC y la proteína represora NtrR están involucradas en la expresión de los genes reguladores de los genes *nod*, *NodD3* y *SyrM* en *S. meliloti*.

### 5.1. LA PROTEÍNA GlnD.-

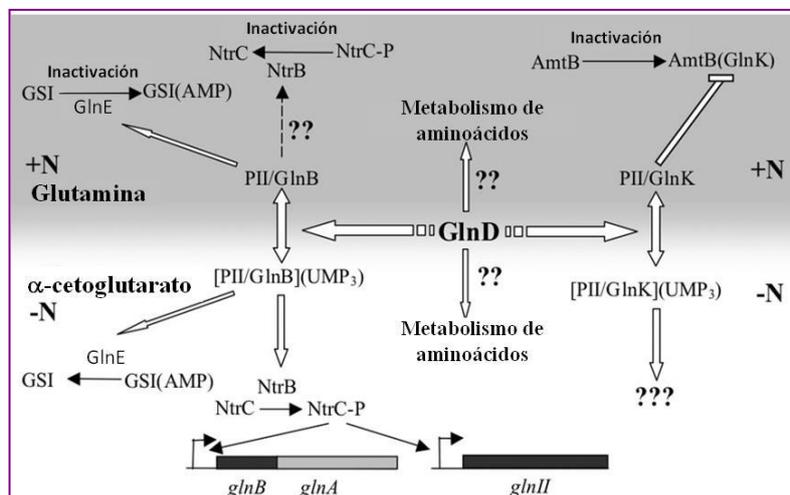
La proteína GlnD desempeña un papel clave en el metabolismo de los compuestos nitrogenados en los rizobios. GlnD es una enzima bifuncional que actúa como sensor del estado de nitrógeno intracelular. Su actividad varía en respuesta a la relación glutamina/ $\alpha$ -cetoglutarato que exista en la célula de manera que modifica el estado de las proteínas P<sub>II</sub>, GlnB y GlnK, bien transfiriendo o bien retirando grupos UMP. A su vez las proteínas P<sub>II</sub> modificarán el estado de otras proteínas o la expresión de ciertos genes para integrar la respuesta celular. En la **Figura I12** se muestra un modelo de su funcionamiento.

Como se observa en la mitad superior de la **Figura I12**, cuando el nitrógeno es abundante (alta relación glutamina/ $\alpha$ -cetoglutarato), la proteína GlnD retira UMP de las proteínas P<sub>II</sub>. En estas condiciones la proteína GlnK se une al transportador AmtB e inhibe la captación de amonio y la proteína GlnB interacciona con la proteína GlnE (adeniltransferasa) que añade AMP de forma gradual a la GS hasta inactivarla, por lo que no tiene lugar la asimilación de amonio. Igualmente GlnB interacciona con la proteína kinasa NtrB, que entonces defosforila al activador transcripcional NtrC deteniéndose el catabolismo de los compuestos nitrogenados.

Como se observa en la mitad inferior de la **Figura I12**, en condiciones limitantes de nitrógeno (baja relación glutamina/ $\alpha$ -cetoglutarato) la proteína GlnD añade grupos UMP a las proteínas P<sub>II</sub> modificándolas de forma reversible. La proteína GlnK-UMP no puede unirse al transportador AmtB, por lo que en estas condiciones tiene lugar la captación de amonio por la bacteria. La proteína GlnB-UMP interacciona con la proteína GlnE haciendo que retire gradualmente el AMP de la GSI. De esta forma se activa a la GSI y, en consecuencia, tiene lugar la asimilación de amonio en la célula.

## Introducción

Además, la proteína GlnB-UMP interacciona con NtrB haciendo que esta enzima fosforile a NtrC. La proteína NtrC-P activa la transcripción de otros genes implicados en la degradación de diferentes compuestos nitrogenados liberándose amonio.



**Figura I12.-** Modelo de la regulación mediada por la proteína GlnD en los rizobios (Yurgel & Kahn, 2008).

En base a su papel central en el sistema *ntr*, la proteína GlnD ha sido objeto de diversos estudios en varios organismos. A diferencia de lo que ocurre en las enterobacterias, en las que la GS queda inactivada (van Heeswijk *et al.*, 1992), la mutación de *glnD* en *A. vinelandii* no tiene efecto en el metabolismo de los compuestos nitrogenados. Como el sistema de dos componentes NtrC-NtrB en *A. vinelandii* es semejante al de *E. coli*, se sugirió que otras quinastas podrían estar actuando en la fosforilación de NtrC. Sin embargo, estos mutantes fueron incapaces de fijar nitrógeno, lo que probablemente se deba a la inactivación de NifL por GlnB-UMP en condiciones limitantes de nitrógeno (Contreras *et al.*, 1991). En *Rhizobium* (*R. tropici* y *R. leguminosarum*) la mutación del gen *glnD* generó los efectos contrarios. El metabolismo de los compuestos nitrogenados se alteró (NtrC<sup>-</sup>) causando la pérdida de la capacidad de crecer con nitrato como única fuente de nitrógeno. No se observa ni la uridilación de la proteína P<sub>II</sub> ni la inducción del gen *glnII*, lo que sugiere que estos mutantes tienen una proteína P<sub>II</sub> desuridilada permanentemente y, como consecuencia, son incapaces de activar la transcripción de promotores dependientes de *ntrC*. Sin embargo, la capacidad de fijar nitrógeno y la actividad GS no sufren alteraciones indicando que, en este caso, parte del sistema *ntr* funciona en simbiosis (O'Connell *et al.*, 1998; Schlüter *et al.*, 2000).

Hasta la fecha sólo se han podido caracterizar los efectos de las mutaciones realizadas en el extremo 3' del gen *glnD*. Los intentos de anular el gen *glnD* por inserciones o deleciones en la porción central y/o *N*-terminal han sido letales en la mayoría de los organismos. Se conoce la existencia de diferentes dominios funcionales en la proteína GlnD (**Tabla I5**).

**Tabla I5.-** Dominios funcionales de la proteína GlnD (Zhang *et al.*, 2010).

<b>Dominio</b>	<b>Localización</b>	<b>Función</b>
NT	<i>N</i> -terminal	Actividad UTasa
HD	Central	Actividad UR
ACT	<i>C</i> -terminal	Regulación de ambas actividades en respuesta a la glutamina u otros efectores

Schlüter *et al.* (2000) demostraron que el extremo *N*-terminal de la proteína GlnD de *R. leguminosarum* es esencial para su funcionamiento en la célula, ya que deleciones en la región 5' del gen parecen ser letales y las mutaciones que afectan a la expresión de la primera parte de la proteína tienen un efecto significativo sobre la viabilidad de la estirpe mutante. En *A. vinelandii* una mutación nula en el gen *glnD* (pérdida de función del gen) sólo puede ser mantenida si una segunda mutación impide la adenilación de la GS para mantenerla activa (Colnaghi *et al.*, 2001). En *S. meliloti* no se han podido aislar mutantes en el gen *glnD*. La letalidad en este caso podría estar relacionada con un efecto polar sobre otros genes esenciales, ya que las mutaciones adicionales que previenen la adenilación de la GS no son suficientes para recuperar la viabilidad celular (Rudnick *et al.*, 2001). Más recientemente, Yurgel & Kahn (2008) han demostrado que los mutantes de *S. fredii* con una deleción en el extremo *N*-terminal de la proteína GlnD pueden fijar nitrógeno en los nódulos de alfalfa, pero la planta no puede usar el nitrógeno fijado que recibe, lo que disminuye la efectividad de la simbiosis.

Se ha descrito que la mutación del gen *glnD* puede generar múltiples fenotipos no necesariamente relacionados con el metabolismo del nitrógeno. Así los mutantes en *glnD* de *Vibrio fischeri* tienen afectado su crecimiento en varias fuentes de nitrógeno, persistencia simbiótica y, también en su capacidad de producir sideróforos y crecer bajo condiciones limitantes de hierro (Graf & Ruby, 2000). En *R. tropici* CIAT899 la mutación de *glnD* inhibe la clorosis que la bacteria causa en plantas de judía (O'Connell

## Introducción

*et al.*, 1998), y en *E. coli* se ven afectados procesos como la división celular (Powell & Court, 1998) y la acumulación de gránulos de polifosfato (Ault-Riché *et al.*, 1998).

### 6. EL MACROSIMBIONTE. *Phaseolus vulgaris* Y *Leucaena leucocephala*.-

Las leguminosas (familia *Fabaceae*) constituyen una de las familias más grandes entre las plantas con flor y la segunda familia de plantas con mayor importancia económica para el hombre, por detrás de las Gramíneas. Esta familia engloba unos 700 géneros y casi 18000 especies (Broughton *et al.*, 2003) con una amplia diversidad tanto morfológica como ecológica y de hábitat, incluyendo desde herbáceas anuales hasta árboles tropicales.

De entre todas las leguminosas, la judía (*Phaseolus vulgaris* L.) es la más extensamente cultivada a lo largo del planeta, participando en la nutrición de cerca de 500 millones de personas de América Latina y del este y sur de África. Es originaria de Mesoamérica y de la región andina de América del Sur (Tohme *et al.*, 1995). En la actualidad su distribución es cosmopolita, teniendo representación en todos los continentes (Martínez-Romero, 2003). *P. vulgaris* es una planta con pocos requerimientos nutricionales lo que hace que la competición por los recursos con otras plantas sea mínima y permite su entresiembrado con otras especies, como árboles frutales o plantaciones de café. Asimismo la judía es una especie de enorme variabilidad genética, existiendo miles de cultivares que producen semillas de los más diversos colores, formas y tamaños (Broughton *et al.*, 2003). La judía desarrolla nódulos de tipo determinado, y es considerada una planta promiscua por su capacidad de establecer simbiosis efectiva con un grupo genéticamente heterogéneo de rizobios originarios de diferentes partes del mundo (Laeremans & Vanderleyden, 1998; Martínez-Romero, 2003). En las zonas de origen de esta planta, la especie que predomina en la ocupación de los nódulos es *R. etli*. En los lugares donde *P. vulgaris* ha sido introducida, la diversidad de rizobios que se aíslan de los nódulos incluyen estirpes de *R. etli*, *R. tropici*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. gallicum* y *R. giardinii*. Cuando los experimentos se llevan a cabo en condiciones controladas y asépticas, *P. vulgaris* es nodulada por un gran número de rizobios muy superior a los que se encuentran en los campos de cultivo (Martínez-Romero, 2003).

Por otra parte, la leucena [*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit] es una leguminosa de crecimiento rápido y muy utilizada como fuente de proteínas para el

ganado, tanto en verde como en seco. Es un árbol que puede alcanzar hasta 18 m de altura, aunque a veces adquiere porte arbustivo, y del que existen más de 100 cultivares en el mundo. Es nativa de las tierras semiáridas de América Central y México. Actualmente se cultiva en todas las regiones tropicales de América, Asia, África, Australia y el Caribe, estimándose que su superficie cultivada mundial oscila entre 3 y 4 millones de hectáreas. Desarrolla nódulos de tipo indeterminado, y sus simbiontes más habituales pertenecen a los géneros *Rhizobium* y/o *Bradyrhizobium* (Wang *et al.*, 1999). Su valor nutritivo es igual o mayor al de la alfalfa y su cultivo ha tenido gran importancia, además de como recurso forrajero, en programas de mejora y recuperación de suelos, control de erosión y planes de reforestación (Shelton *et al.*, 2005). Su madera seca ha demostrado poseer casi el 40 % del valor calórico del petróleo, siendo también una fuente importante de energía (Gopalakrishnan *et al.*, 1993; Shelton & Brewbaker, 1994).

### 7. EL MICROSIMBIONTE. *Rhizobium tropici* CIAT899.-

*Rhizobium tropici*, clasificada inicialmente como *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli tipo II, está presente de forma natural en los suelos de América, Francia y en diferentes áreas de África (Martínez-Romero *et al.*, 1991; Amarger *et al.*, 1994; Hungría *et al.*, 2000; Priefer *et al.*, 2001; Zurdo-Piñeiro *et al.*, 2004). Por lo general, las estirpes de esta especie nodulan bien en suelos ácidos y parecen estar muy bien adaptadas a los suelos arenosos. En base a las secuencias del ARNr 16S, hibridaciones ADN-ADN y análisis de sus características fenotípicas, se distinguen dos tipos dentro de esta especie, A y B, que parecen ser divergentes pero presentan un plásmido simbiótico común (Martínez-Romero & Caballero-Mellado, 1996). Sin embargo, existen también estirpes de *R. tropici* con características intermedias entre ambos tipos (Hungría *et al.*, 2000; Mostasso *et al.*, 2002). Los *R. tropici* del tipo A se asocian con *P. vulgaris*, *Leucaena* spp. y *Amorpha fruticosa* (Sawada *et al.*, 2003), mientras que los *R. tropici* del tipo B establecen simbiosis con *P. vulgaris*, *Leucaena* spp. y *Macroptilium atropurpureum* (Hernández-Lucas *et al.*, 1995). Solamente el tipo B puede crecer a 37°C, tolera la presencia de metales pesados y altas concentraciones de NaCl (Martínez-Romero, 2003).

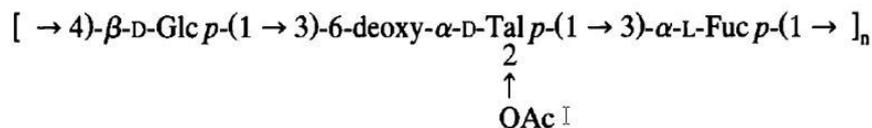
*Rhizobium tropici* CIAT899 es la estirpe de referencia dentro del tipo B por lo que ha sido muy estudiada. Se conoce desde hace muchos años como típico simbionte de judía y está catalogada como una bacteria altamente tolerante a diversos tipos de

## Introducción

estrés abiótico (Hungria *et al.*, 2003). Esta característica ha hecho que sea utilizada como organismo modelo para el estudio de diversas propiedades simbióticas en condiciones medioambientales extremas (Martínez-Romero *et al.*, 1991; Graham *et al.*, 1994; Nogales *et al.*, 2002; Vinuesa *et al.*, 2003) además de haber demostrado ser un buen inoculante bajo dichas condiciones en distintas áreas de experimentación (Vlassak *et al.*, 1996; Morón *et al.*, 2005). El genoma de esta bacteria está constituido por un cromosoma y tres plásmidos: pRtCIAT899a (~218 Kb), común en diversas estirpes de *Rhizobium* tolerantes al estrés salino, pRtCIAT899b (~540 Kb) o plásmido simbiótico (pSym), en el que se encuentran los genes responsables de la nodulación, y pRtCIAT899c (~2,1 Mb) o megaplásmido, también presente en otras estirpes que nodulan en judía como *R. etli* (Acosta-Durán & Martínez-Romero, 2002; Shamseldin, 2007). *R. tropici* CIAT899 destaca por su elevada estabilidad genética, superior a la de los demás rizobios que nodulan judía, manteniendo sus propiedades simbióticas bajo diferentes condiciones de estrés (Hungria *et al.*, 2000). *R. tropici* CIAT899 tolera concentraciones de hasta 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  y 200  $\mu\text{M}$  de Mn (Vargas & Graham, 1988) y puede crecer a pH 4,25, con elevadas concentraciones de NaCl y muy altas presiones osmóticas (Nogales *et al.*, 2002). Como mecanismos de osmoadaptación utilizados por el género *Rhizobium* destacan el incremento en los niveles de  $\text{K}^+$  intracelular, regulación del pH citoplasmático, acumulación de solutos compatibles como glutamato, la producción de proteínas chaperonas y la modificación de la composición de la membrana (Graham, 1992).

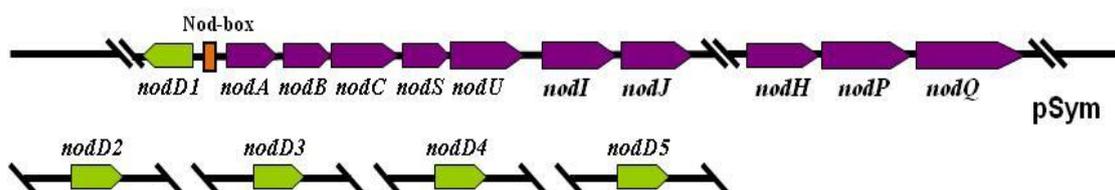
Algunos de los polisacáridos superficiales de *R. tropici* CIAT899 han sido estudiados en detalle. Así, Gil-Serrano *et al.* (1990) determinaron que la unidad repetitiva del EPS de esta bacteria consiste en un octasacárido de D-glucosa, D-galactosa, ácido pirúvico y ácido acético en proporción molar 6:2:1,5:1,5. Igualmente, Gil-Serrano *et al.* (1994b) identificaron varios ácidos grasos hidroxilados como constituyentes del lípido A del LPS de *R. tropici* CIAT899. En este estudio se resalta el valor taxonómico de dos ácidos grasos de muy larga cadena, el ácido 27-hidroxiocacosanoico y el ácido 29-hidroxitriacontanoico, presentes en estas moléculas. Además, se ha determinado la estructura química completa del antígeno O del LPS de esta bacteria, desde su secuencia primaria de carbohidratos (Gil-Serrano *et al.*, 1995) (**Figura I13**) hasta la conformación tridimensional que adopta en solución (Bernabé *et*

*al.*, 1995). De igual forma se han analizado los glucanos cíclicos producidos por esta estirpe (Gil-Serrano *et al.*, 1994a).



**Figura I13.-** Unidad repetitiva del antígeno O de *R. tropici* CIAT899 (Gil-Serrano *et al.*, 1995). Fuc: fucosa; Glc: glucosa; OAc: grupo O-acetilo; Tal: talosa; *n*: grado de polimerización.

Por otra parte, Vargas *et al.* (1990) estudiaron por primera vez los genes de nodulación de *R. tropici* CIAT899. Hasta el día de hoy se ha identificado el operón *nodDABCSUIJHPQ*, que se localiza en el plásmido simbiótico precedido de una caja *nod* y del gen regulador *nodD1*. En su trabajo, van Rhijn *et al.* (1993) describen la existencia de cuatro copias más del gen regulador *nodD* que aparentemente se localizan sin agrupar en el plásmido simbiótico de esta estirpe (**Figura I14**). Se han obtenido diferentes mutantes que ponen de manifiesto el papel de todos estos genes *nod* y de *nodD1* en la simbiosis con *P. vulgaris* (Sousa *et al.*, 1993; van Rhijn *et al.*, 1994; Folch-Mallol *et al.*, 1998; Manyani *et al.*, 2001).



**Figura I14.-** Mapa genético de los genes de nodulación de *R. tropici* CIAT899. Las flechas indican el sentido de la transcripción (Folch-Mallol *et al.*, 1996). pSym: plásmido simbiótico.

Folch-Mallol *et al.* (1996) analizaron por primera vez la estructura de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 y establecieron que su esqueleto básico está constituido por un oligosacárido de 3 a 5 unidades de *N*-acetil-D-glucosamina. Sus decoraciones más frecuentes son el grupo sulfato en el extremo reductor y los grupos carbamoilo, metilo y acilo en el extremo no reductor. En base a la naturaleza de estas sustituciones, los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 se han clasificado en dos familias: una hidrofílica, que contiene compuestos sulfatados, y una familia más hidrofóbica, que comprende la fracción no sulfatada (Morón B. Tesis Doctoral, 2004). Esta variabilidad estructural de factores Nod se ha relacionado con el amplio rango de hospedadores que esta bacteria es capaz de nodular. Así, mientras la

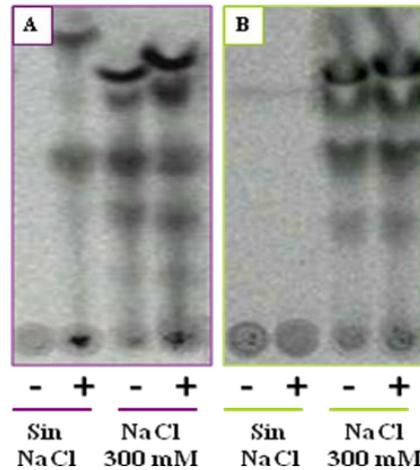
## Introducción

presencia de un ácido graso en el extremo no reductor de los factores Nod se considera suficiente para que *R. tropici* CIAT899 nodule en judía (Laeremans & Vanderleyden, 1998), el grupo sulfato en el extremo reductor es imprescindible para la nodulación en plantas como leucena (Folch-Mallol *et al.*, 1996).

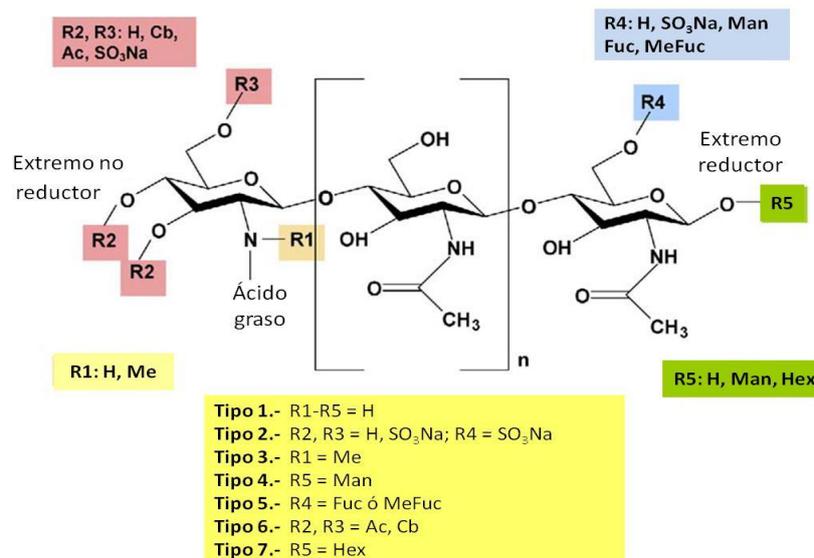
Por otra parte, se ha demostrado que el perfil de producción de factores Nod de *R. tropici* CIAT899 varía enormemente dependiendo de las condiciones de crecimiento de la bacteria. Laeremans & Vanderleyden (1998) ya indicaron que el estrés, tanto biótico como abiótico, podía afectar a la producción de factores Nod en los rizobios. Morón *et al.* (2005) realizaron el primer estudio descriptivo de este fenómeno en *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones de acidez. Este trabajo indica que *R. tropici* CIAT899 produce 52 factores Nod diferentes cuando crece con apigenina como flavonoide inductor en condiciones de estrés por acidez (pH 4,5), mientras que al crecer con apigenina a pH neutro produce 29 factores Nod, y sólo 15 de ellos son comunes en ambas condiciones. Entre los 37 factores Nod identificados exclusivamente en condiciones de acidez, se describieron estructuras no observadas hasta entonces como los factores Nod doblemente sulfatados [V(C<sub>18:1</sub>, NMe, S, S)] o moléculas con manosa como parte de su esqueleto molecular entre otras [V(C<sub>10:0-OH</sub>, Cb); V(C<sub>10:0-OH</sub>, NMe, Cb); IV-Hex(C<sub>10:0-OH</sub>, Cb); IV-Hex(C<sub>12:0</sub>, NMe); IV-Hex(C<sub>18:1</sub>, NMe)]. La capacidad de *R. tropici* CIAT899 de nodular no se vio afectada en condiciones de acidez, por lo que los autores sugieren que la mayor diversidad de factores Nod producidos en estas condiciones podría ayudar a minimizar los efectos adversos de la acidez del suelo durante el desarrollo nodular o incluso contribuir a la estabilidad de los factores Nod en dichas condiciones.

Del mismo modo, se ha estudiado el efecto de las altas concentraciones de NaCl sobre la producción de factores Nod de *R. tropici* CIAT899. Estévez, J. en su Tesis Doctoral (2007) analizó por cromatografía en capa fina (CCF-R) el perfil de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 con NaCl 300 mM (**panel A** de la **Figura I15**), observando que la producción se incrementa respecto a lo producido con apigenina y que, además, bajo estrés salino la producción de factores Nod se hace independiente de la presencia del flavonoide. En la **Tabla II** del Apéndice se muestran los factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899 sin apigenina. Estévez *et al.*, (2009) identificaron 46 factores Nod estructuralmente diferentes producidos por *R. tropici* CIAT899 al crecer con apigenina bajo estrés salino (NaCl 300 mM) y los clasificaron en varios tipos

en función de la naturaleza de sus radicales (**Figura I16**). Cuando la apigenina se emplea como inductor se identifican 29 factores Nod, de los que 15 son comunes a los producidos con NaCl 300 mM y apigenina (**Tabla I** del Apéndice). En su trabajo, Estévez *et al.* (2009) concluyen que el incremento en la producción de factores Nod que se observa con NaCl 300 mM es un efecto Na<sup>+</sup>-dependiente, y que el conjunto de los factores Nod producidos en estas condiciones tiene actividad biológica pues induce la formación de pseudonódulos en plantas de judía (*P. vulgaris* cv. Negro Jamapa).



**Figura I15.-** Análisis mediante cromatografía en capa fina de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 (**panel A**) y *R. tropici* RSP82 (**panel B**) en medio B<sup>-</sup> con y sin NaCl 300 mM y con *N*-acetil-D-<sup>14</sup>C-glucosamina como precursor radiactivo (tomado de Estévez, J. Tesis Doctoral, 2007). Los carriles con signo positivo corresponden a los cultivos inducidos con 1 µg/mL de apigenina.



**Figura I16.-** Variabilidad estructural de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 bajo estrés salino (NaCl 300 mM) (tomado de Estévez *et al.*, 2009). Ac: grupo acetilo; Cb: grupo carbamoilo; Fuc: fucosa; H: hidrógeno; Hex: hexosa; Man: manosa; Me: grupo metilo; MeFuc: metilfucosa; n: 2 ó 3 residuos de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y SO<sub>3</sub>Na: grupo sulfato.

## Introducción

Además, la expresión de los genes *nod* en *R. tropici* CIAT899 en condiciones de estrés salino (NaCl 300 mM) no sigue la clásica vía de regulación activada por flavonoides y mediada por NodD1. Como demostró Estévez, J. en su Tesis Doctoral (2007), la estirpe RSP82, derivada de *R. tropici* CIAT899 mutada en el gen *nodD1*, no produce factores Nod en ausencia de estrés salino pero produce factores Nod con NaCl 300 mM, tanto en presencia como en ausencia de apigenina (**panel B** de la **Figura I15**).

Este fenómeno de regulación del proceso de síntesis de los factores Nod con NaCl 300 mM en ausencia de flavonoides y NodD1 enfatiza la importancia de las condiciones ambientales en el estudio biológico de los factores Nod, y abre un nuevo campo de búsqueda y caracterización de genes modulados por el ambiente e implicados en la interacción del rizobio con su entorno. El conocimiento de estos nuevos mecanismos de regulación de los factores Nod podría ayudar a optimizar, en la medida de lo posible, aquellas simbiosis influidas negativamente por el entorno salino en el que se desarrollan.

## *Objetivos*

---



En función de los antecedentes comentados, los Objetivos de esta Tesis Doctoral han sido:

1. Obtener, mediante mutagénesis al azar, mutantes de *R. tropici* CIAT899 afectados en la producción de factores Nod bajo estrés salino sin flavonoides.
2. Estudiar genética y fisiológicamente los mutantes de interés que se obtengan, y analizar sus propiedades simbióticas en plantas de judía y de leucena.
3. Identificar proteínas que se expresen diferencialmente en *R. tropici* CIAT899 bajo estrés salino que ayuden a conocer los componentes de la ruta de síntesis de factores Nod activada por el estrés en ausencia de flavonoides.



## *Material y Métodos*

---



## 1. MATERIAL BIOLÓGICO.-

### 1.1. BACTERIAS Y PLÁSMIDOS.-

Las estirpes bacterianas y los plásmidos usados en esta Tesis se muestran por orden alfabético en las **Tablas M1** y **M2**, respectivamente.

**Tabla M1.-** Bacterias utilizadas en esta Tesis.

Estirpes	Características relevantes	Fuente/Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	SupE44, $\Delta$ lacU169, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1, Nx <sup>R</sup>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
S17-1	294Rec <sup>-</sup> , RP4-2tet::Mu-neo::Tn7 integrado en el cromosoma. Str <sup>R</sup>	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>Klebsiella sp.</i>		
AMG100	Productora de ácido indolacético (AIA), celulasa, ureasa y fijadora de N <sub>2</sub>	del Castillo, I. Tesis Doctoral, 2010
<i>Pantoea sp.</i>		
AMG520	Productora de ácido indolacético (AIA), sideróforos, celulasa, AHL y solubilizadora de fosfato	del Castillo, I. Tesis Doctoral, 2010
<i>Rhizobium sulae</i>		
IS123	Positiva en calcoflúor	Espuny <i>et al.</i> , 1987
<i>Rhizobium tropici</i>		
CIAT899	Estirpe silvestre de referencia tipo IIB. Rif <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup>	Martínez-Romero <i>et al.</i> , 1985
CIAT899[pMP220]	CIAT899 con el plásmido pMP220, portador del gen <i>lacZ</i> sin promotor. Rif <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis
CIAT899[pMP240]	CIAT899 con el plásmido pMP240, portador de la fusión <i>pnodA</i> de <i>R. leguminosarum</i> bv. viciae al gen <i>lacZ</i> sin promotor. Rif <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Dardanelli <i>et al.</i> , 2008
CIAT899[pMP4641]	CIAT899 con el plásmido pMP4641, portador del gen que codifica la proteína de fluorescencia azul BFP. Rif <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis
CIAT899[pMP4655]	CIAT899 con el plásmido pMP4655, portador del gen que codifica la proteína de fluorescencia verde GFP. Rif <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis

## Material y Métodos

Tabla M1.- Continuación

Estirpes	Características relevantes	Fuente/Referencia
CIAT899[pMUS1066]	CIAT899 con el plásmido pMUS1066, portador de una copia silvestre del gen <i>bgvA</i> . Rif <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	Esta Tesis
CIAT899[pMUS1067]	CIAT899 con el plásmido pMUS1067, portador de los genes del hipotético operón al que pertenece el gen <i>bgvA</i> . Rif <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	Esta Tesis
CIAT899[pMUS1068]	CIAT899 con el plásmido pMUS1068, portador de una copia silvestre del gen <i>glnD</i> . Rif <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	Esta Tesis
Cp1	CIAT899[pMP240] con inserción al azar de Tn5-Mob. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis
Cp2	CIAT899[pMP240] con inserción al azar de Tn5-Mob. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis
Cp3	CIAT899[pMP240] con inserción al azar de Tn5-Mob. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis
Cp4	CIAT899[pMP240] con inserción al azar de Tn5-Mob. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis
Cp5	CIAT899[pMP240] con inserción al azar de Tn5-Mob. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis
Cp6	CIAT899[pMP240] con inserción al azar de Tn5-Mob. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis
Cp7	CIAT899[pMP240] con inserción al azar de Tn5-Mob y curada del pSym. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis
Cp8	CIAT899[pMP240] con Tn5-Mob inserto en el gen <i>glnD</i> . Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis
Cp9	CIAT899[pMP240] con Tn5-Mob inserto en el gen <i>bgvA</i> . Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis
Cp10	CIAT899[pMP240] con inserción al azar de Tn5-Mob. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis
Cp11	CIAT899[pMP240] con inserción al azar de Tn5-Mob. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis
Cp12	CIAT899[pMP240] con inserción al azar de Tn5-Mob. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis
Cp13	CIAT899[pMP240] con inserción al azar de Tn5-Mob. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis
Cp14	CIAT899[pMP240] con inserción al azar de Tn5-Mob. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis
Cp15	CIAT899[pMP240] con inserción al azar de Tn5-Mob. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis

Tabla M1.- Continuación

Estirpes	Características relevantes	Fuente/Referencia
Cp16	CIAT899[pMP240] con inserción al azar de Tn5-Mob. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis
C7	Cp7 curada del plásmido pMP240. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Esta Tesis
C8	Cp8 curada del plásmido pMP240. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Esta Tesis
C8g	Clon de la estirpe C8 con tamaño de colonia grande y velocidad de crecimiento similar a la de CIAT899 en medios con nitrato como única fuente de nitrógeno. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Esta Tesis
C8 [pMP4641]	C8 con el plásmido pMP4641, portador del gen que codifica la proteína con fluorescencia azul BFP. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis
C8 [pMP4655]	C9 con el plásmido pMP4655, portador del gen que codifica la proteína con fluorescencia verde GFP. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis
C8[pMUS1050]	C8 con el plásmido pMUS1050, portador del gen <i>glnD</i> bajo el control del promotor del gen <i>lacZ</i> . Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	Esta Tesis
C8[pMUS1068]	C9 con el plásmido pMUS1068, portador de una copia silvestre del gen <i>glnD</i> con su propio promotor. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	Esta Tesis
C9	Cp9 curada del plásmido pMP240. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Esta Tesis
C9 [pMP4641]	C9 con el plásmido pMP4641, portador del gen que codifica la proteína con fluorescencia azul BFP. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis
C9 [pMP4655]	C9 con el plásmido pMP4655, portador del gen que codifica la proteína con fluorescencia verde GFP. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Esta Tesis
C9[pMUS1066]	C9 con el plásmido pMUS1066, portador de una copia silvestre del gen <i>bgvA</i> . Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	Esta Tesis
C9[pMUS1067]	C9 con el plásmido pMUS1067, portador de los genes del hipotético operón al que pertenece el gen <i>bgvA</i> . Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	Esta Tesis
C11	Cp11 curada del plásmido pMP240. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Esta Tesis
Mut3	RSP3051 con inserción al azar de Tn5-Mob. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Esta Tesis

## Material y Métodos

**Tabla M1.-** Continuación

Estirpes	Características relevantes	Fuente/Referencia
Mut4	RSP3051 con inserción al azar de Tn5-Mob. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Esta Tesis
Mut5	RSP3051 con inserción al azar de Tn5-Mob. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Esta Tesis
Mut6	RSP3051 con inserción al azar de Tn5-Mob. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Esta Tesis
Mut7	RSP3051 con inserción al azar de Tn5-Mob. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Esta Tesis
Mut8	RSP3051 con inserción al azar de Tn5-Mob. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Esta Tesis
Mut9	RSP3051 con inserción al azar de Tn5-Mob. Rif <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Esta Tesis
RSP3051	CIAT899 portadora de la fusión transcripcional <i>nodP::lacZ-Gm</i> en el pSym. Rif <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	Manyani <i>et al.</i> , 2001
RSP900	CIAT899 curada del pSym. Rif <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup>	Vargas <i>et al.</i> , 1990
SVQ689	CIAT899 con el interposón $\Omega$ inserto en el punto <i>HindIII</i> del gen <i>bgvA</i> . Rif <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Esta Tesis
<b><i>Sinorhizobium fredii</i></b>		
SMH12	Estirpe silvestre	Rodríguez-Navarro <i>et al.</i> , 1996

**Tabla M2.-** Plásmidos utilizados en esta Tesis.

Plásmidos	Características relevantes	Fuente/Referencia
pAB2001	Plásmido que contiene el "cassette" <i>lacZ-Gm</i> . Amp <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	Becker <i>et al.</i> , 1995
pBBR1MCS-5	Plásmido pBBR1MCS con inserción de un "cassette" que confiere resistencia a Gm. Gm <sup>R</sup>	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pBluescript II KS y SK+/-	Vector de clonación y secuenciación, <i>lacZ</i> , Amp <sup>R</sup>	Stratagene
pGEM-T Easy	Vector de clonación de productos de PCR, Amp <sup>R</sup>	Promega
pHP45 $\Omega$	Plásmido que contiene el interposón $\Omega$ , Spc <sup>R</sup> /Str <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	Prentki & Krisch, 1984
pK18mob	Vector de clonación (suicida en los rizobios), Km <sup>R</sup>	Schäfer <i>et al.</i> , 1994

Tabla M2.- Continuación

Plásmidos	Características relevantes	Fuente/Referencia
pMBL-T	Vector de clonación de productos de PCR, Amp <sup>R</sup>	Dominion MBL
pMP220	Plásmido portador del gen <i>lacZ</i> sin promotor, Tc <sup>R</sup>	Spaink <i>et al.</i> , 1987
pMP240	Plásmido portador de la fusión <i>pnodA</i> de <i>R.leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> al gen <i>lacZ</i> sin promotor, Tc <sup>R</sup>	de Maagd <i>et al.</i> , 1988
pMUS442	Plásmido pSUP202 que lleva clonado en el punto <i>PstI</i> un fragmento de 0,9 kb del gen de la resistencia a kanamicina de Tn5, Cm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Madinabeitia <i>et al.</i> , 2002
pRK2013	Plásmido coadyuvante, Km <sup>R</sup>	Figurski & Helinski, 1979
pMP4641	Plásmido portador del gen que codifica la proteína con fluorescencia azul BFP. Tc <sup>R</sup>	Bloemberg <i>et al.</i> , 2000
pMP4655	Plásmido portador del gen que codifica la proteína con fluorescencia verde GFP.Tc <sup>R</sup>	Bloemberg <i>et al.</i> , 2000
pMUS1030	Plásmido pBluescript II SK+ que contiene el fragmento <i>EcoRI-BamHI</i> de ~ 3,8 kb rescatado del clon C8g	Esta Tesis
pMUS1031	Plásmido pBluescript II SK+ que contiene el fragmento <i>EcoRI-BamHI</i> de ~ 4 kb rescatado del mutante C9	Esta Tesis
pMUS1034	Plásmido pBluescript II SK+ que contiene el fragmento <i>EcoRI-BamHI</i> de ~ 4 kb rescatado del mutante C8	Esta Tesis
pMUS1041	Plásmido pGEM-T Easy que contiene el gen <i>glnD</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899 sin promotor	Esta Tesis
pMUS1047	Plásmido pMBL que contiene el gen <i>glnD</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899 con su zona promotora	Esta Tesis
pMUS1050	Plásmido pBBR1MCS-5 que contiene un fragmento <i>ApaI-SacI</i> de ~3,5 kb, procedente de pMUS1041, que porta el gen <i>glnD</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899	Esta Tesis
pMUS1060	Plásmido pMBL que contiene el operón al que pertenece el gen <i>bgvA</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899	Esta Tesis
pMUS1066	Plásmido pBBR1MCS-5 que contiene un fragmento <i>BamHI-XbaI</i> de ~1,5 kb, procedente de pMUS1115, que porta el gen <i>bgvA</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899	Esta Tesis
pMUS1067	Plásmido pBBR1MCS-5 que contiene un fragmento <i>BamHI-XbaI</i> de ~7,1 kb, procedente de pMUS1060, que porta el hipotético operón al que pertenece <i>bgvA</i> en <i>R. tropici</i> CIAT899	Esta Tesis

## Material y Métodos

Tabla M2.- Continuación

Plásmidos	Características relevantes	Fuente/Referencia
pMUS1068	Plásmido pBBR1MCS-5 que contiene un fragmento <i>XhoI-BamHI</i> de ~3,5 kb, procedente de pMUS1047, que porta el gen <i>glnD</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899	Esta Tesis
pMUS1072	Plásmido pGEM-T Easy que contiene el gen <i>bgvA</i> de <i>R.tropici</i> CIAT899	Esta Tesis
pMUS1073	Plásmido pMUS1072 con el interposón $\Omega$ inserto en el punto <i>HindIII</i> del gen <i>bgvA</i> de <i>R.tropici</i> CIAT899	Esta Tesis
pMUS1075	Plásmido pK18mob que contiene un fragmento <i>EcoRI</i> de ~ 3,5 kb, procedente de pMUS1073, que porta el gen <i>bgvA</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899 mutado con el interposón $\Omega$	Esta Tesis
pMUS1115	Plásmido pMBL que contiene el gen <i>bgvA</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899	Esta Tesis
pSUP202	Vector de clonación suicida en bacterias Gram-negativas. Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Simon <i>et al.</i> , 1983
pSUP5011	Plásmido pBR325 por delección del gen Tc <sup>r</sup> , integración del transposón Tn5 y clonación en <i>BamHI</i> de la secuencia IncP específica del sitio de movilización de plásmidos mob. Km <sup>R</sup>	Reinhard Simon, 1984

### 1.2. PLANTAS.-

Los ensayos de nodulación y competitividad en nodulación se realizaron con plantas leguminosas de dos especies distintas: *Phaseolus vulgaris* L. cv. Negro Jamapa y *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.

### 2. ANTIBIÓTICOS, FLAVONOIDES Y TAMPONES.-

#### ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos empleados fueron suministrados por las casas Sigma-Aldrich y USB. Se prepararon soluciones concentradas disolviendo los antibióticos en agua destilada, excepto la rifampicina y la tetraciclina, que se disolvieron en metanol y en etanol al 70 % (v/v), respectivamente. Para la disolución del ácido nalidíxico se añadieron 0,04 volúmenes de NaOH 5M. En la **Tabla M3** se indican las concentraciones de trabajo utilizadas. Todos los antibióticos se conservaron a -20°C.

**Tabla M3.** Antibióticos utilizados en esta Tesis.

Antibiótico	Concentración de trabajo ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Rhizobium</i>
Ácido nalidíxico (Nal)	10	20
Ampicilina (Amp)	100	-
Espectinomicina (Spc)	100	50
Estreptomomicina (Sm)	200	400
Gentamicina (Gm)	10	50
Kanamomicina (Km)	30	60
Rifampicina (Rif)	25	50
Tetraciclina (Tc)	10	10

#### FLAVONOIDES

El flavonoide apigenina (Sigma-Aldrich) se preparó mediante disolución en etanol absoluto a una concentración de 1 mg/mL. Se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se utilizó a una concentración final de  $1\mu\text{g/mL}$  en el medio de cultivo.

#### SOLUCIONES Y TAMPONES

La composición de las soluciones y tampones de trabajo utilizados en esta Tesis se detalla tras la descripción de cada técnica o método empleado. Salvo que se indique lo contrario, las soluciones no se esterilizaron y se conservaron a temperatura ambiente.

### **3. MEDIDAS DE pH Y ESPECTROFOTOMÉTRICAS.-**

El pH de las soluciones se midió con un pH-metro modelo micropH 2001 (Crison). Las medidas de densidad óptica (D.O.) se tomaron seleccionando la longitud de onda apropiada en un espectrofotómetro Novaspec II (Pharmacia LKB).

### **4. MEDIOS DE CULTIVO.-**

Los compuestos empleados en la preparación de los medios de cultivo fueron suministrados en su mayoría por las casas Difco, Merck, Oxoid, Panreac y Pronadisa. Para la preparación de los medios, sus componentes se disolvieron en agua destilada o tipo Milli-Q y, tras ajustar el pH al valor deseado, se esterilizaron en autoclave a una atmósfera de sobrepresión ( $121^{\circ}\text{C}$ ) durante 20 minutos. Los medios sólidos se prepararon de la misma forma que los líquidos añadiéndoles 20 g/L de agar (Oxoid).

## Material y Métodos

### 4.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA *Escherichia coli*.-

#### MEDIO LB (Maniatis *et al.*, 1982)

Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	5 g/L

El pH del medio fue ajustado a 7,0.

### 4.2. MEDIOS DE CULTIVO PARA *Rhizobium*.-

#### MEDIO TY (Beringer, 1974)

Triptona	5 g/L
Extracto de levadura	3 g/L
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,65 g/L

El pH del medio fue ajustado a 7,0.

#### MEDIO YM (Vincent, 1970)

Manitol <sup>a</sup>	10 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
NaCl	0,1 g/L
Extracto de levadura	0,4 g/L

El pH del medio fue ajustado a 7,0.

- a. En ocasiones, para reducir la mucosidad de la bacteria se preparó el medio YM añadiendo 3 g/L en lugar de 10 g/L de manitol, sin modificar las concentraciones del resto de componentes.

#### MEDIO MÍNIMO B (Spaink *et al.*, 1992)

Manitol	10 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,55 g/L
KNO <sub>3</sub>	0,55 g/L
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,30 g/L
Fe(III)-NaEDTA <sup>a</sup>	2,5 mL/L
Oligoelementos <sup>b</sup>	2,5 mL/L

- a. La solución Fe(III)-NaEDTA se preparó independientemente al 1,3 % (m/v) y se esterilizó por filtración (0,45 µm de diámetro de poro).
- b. La solución de oligoelementos consta de:

MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,609 g/L
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,097 g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,269 g/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,398 g/L
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,035 g/L

Se ajustó el pH a 5,0 y se esterilizó en autoclave. Una vez frío se le añadieron 10 mL de  $K_2HPO_4$  1M a pH 7,2 estéril por cada litro de medio. Las vitaminas biotina y tiamina se añadieron, disueltas en  $H_2O$  y esterilizadas por filtración (0,2  $\mu m$  de diámetro de poro), a una concentración final de 0,2 y 5  $\mu g/mL$ , respectivamente.

### MEDIO MÍNIMO RMM (Hooykaas *et al.*, 1977)

Manitol	10 g/L
$KNO_3^a$	1 g/L
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,10 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g/L
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,01 g/L
Oligoelementos <sup>b</sup>	100 $\mu L/L$

a.  $NH_4Cl$  ó glutamina, según el caso.

b. La solución de oligoelementos consta de:

$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,20 g/L
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,20 g/L
$H_3BO_3$	0,20 g/L
$Na_2MoO_4$	0,20 g/L
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,20 g/L
$CoCl_2$	0,02 g/L

Se ajustó el pH a 5,0 y se esterilizó en autoclave. Una vez frío se le añadieron 12 mL de una solución de  $KH_2PO_4$  0,6 M y  $K_2HPO_4$  0,5 M a pH 7,0 estéril por cada litro de medio. Las vitaminas biotina, tiamina y pantotenato cálcico se añadieron, disueltas en  $H_2O$  y esterilizadas por filtración (0,2  $\mu m$  de diámetro de poro), a una concentración final de 10  $\mu g/L$ .

## 5. CONDICIONES DE CULTIVO.-

### 5.1. CONDICIONES DE CULTIVO PARA *E. coli*.-

Las estirpes de *E.coli* se cultivaron a 37°C, durante un periodo de tiempo comprendido entre 14 y 24 horas. Los cultivos en medios líquidos se mantuvieron en condiciones estáticas o en agitación a 180 r.p.m. dependiendo del ensayo.

### 5.2. CONDICIONES DE CULTIVO PARA *Rhizobium*.-

Las estirpes de *Rhizobium* se cultivaron a 28°C, durante al menos 36 horas. Los cultivos en medios líquidos se mantuvieron en agitación a 180 r.p.m. cuando fue necesario.



### 7.1.2. AISLAMIENTO DEL ADN PLASMÍDICO.-

Se usaron diferentes métodos de extracción según el número de copias del plásmido que se quiso obtener y la pureza requerida en los procedimientos posteriores. En todos los casos se empleó *E. coli* DH5- $\alpha$  como estirpe portadora de los plásmidos.

#### 7.1.2.1. AISLAMIENTO DEL ADN DE PLÁSMIDOS CON ALTO NÚMERO DE COPIAS.-

Para extraer plásmidos con alto número de copias se siguió el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Se centrifugaron 1,5 mL de cultivo bacteriano crecido hasta fase estacionaria a 13000 r.p.m. durante 1 minuto. El sedimento celular se resuspendió con suavidad en 100  $\mu$ L de **Solución I**. Luego se añadieron 200  $\mu$ L de **Solución II** preparada en el momento y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces hasta obtener transparencia en la muestra. Posteriormente, se añadieron 150  $\mu$ L de **Solución III** y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces. Se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 8-10 minutos. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v). La mezcla se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 5 minutos. La fase acuosa superior se pasó a un nuevo tubo añadiendo un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v/v). Se mezcló invirtiendo el tubo y se centrifugó de igual manera que en el paso anterior. La fase superior se trasvasó cuidadosamente a un tubo limpio y se añadieron dos volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de su volumen de acetato potásico 3M. La precipitación del ADN se favoreció manteniendo la muestra al menos 30 minutos a -20°C, y se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 20 minutos. Finalmente, el precipitado obtenido se lavó con etanol 70 %, se secó bien y se resuspendió en 20  $\mu$ L de tampón TER. La eficiencia de la extracción se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su uso. Cuando interesó una buena calidad y pureza de la muestra, la extracción del ADN plasmídico se realizó con el kit NucleoSpin® Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel) o el kit Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

#### SOLUCIÓN I

Glucosa <sup>a</sup>	50 mM
Tris-HCl pH 8,0	25 mM
EDTA pH 8,0	10 mM

a. La solución de glucosa se esterilizó por filtración (0,45  $\mu$ m de diámetro de poro).

## **Material y Métodos**

### **SOLUCIÓN II**

NaOH	0,2 M
SDS	1% (m/v)

Se preparó en el momento del uso.

### **SOLUCIÓN III**

Acetato potásico	5 M [60% (v/v)]
Ácido acético glacial	11,5 % (v/v)

#### **7.1.2.2. AISLAMIENTO DEL ADN DE CÓSMIDOS Y DE PLÁSMIDOS CON BAJO NÚMERO DE COPIAS.-**

Para extraer ADN de cósmidos y plásmidos con bajo número de copias se empleó el kit Plasmid Midi (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

#### **7.1.3. AISLAMIENTO DEL ARN.-**

Las bacterias se cultivaron en el medio líquido adecuado hasta que alcanzaron una D.O. a 600 nm de 0,5. La extracción del ARN bacteriano se realizó con el kit RNeasy® Mini Kit (Qiagen) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. La ausencia de ADN contaminante en las muestras de ARN se determinó mediante una PCR control con cebadores específicos. Las muestras de ARN se conservaron a -80°C hasta su uso.

### **7.2. PROCESAMIENTO ENZIMÁTICO DEL ADN.-**

#### **7.2.1. RESTRICCIÓN DEL ADN.-**

Se utilizaron endonucleasas de restricción de las casas Roche y NewEngland Biolabs. Las digestiones se realizaron según el protocolo descrito por Maniatis *et al.* (1982) y Sambrook *et al.* (1989), utilizando los tampones y siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Las digestiones se incubaron a la temperatura indicada, normalmente 37°C, durante al menos 3 horas. Las restricciones del ADN genómico se incubaron toda la noche para obtener una digestión completa del ADN. La eficiencia de la restricción se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa.

#### **7.2.2. DESFOSFORILACIÓN DE VECTORES DE CLONACIÓN.-**

Para eliminar los grupos fosfato 5' terminales de los vectores digeridos y evitar su recircularización en las reacciones de ligación, la mezcla de reacción se trató con la enzima fosfatasa alcalina (Roche) siguiendo las indicaciones de la casa suministradora.

Finalmente, los vectores desfosforilados se purificaron con fenol y se precipitaron con etanol absoluto (**Apartados 7.3 y 7.4**).

### 7.2.3. LIGACIÓN DEL ADN.-

Para clonar un fragmento de ADN en un vector, este fue previamente desfosforilado y, al igual que el inserto, purificado con fenol y precipitado con etanol absoluto. Cuando los fragmentos a ligar tuvieron extremos cohesivos, las reacciones de ligación se realizaron en proporción 1:3 (vector:inserto), aumentándola con el tamaño del inserto. Cuando los fragmentos a ligar tuvieron extremos romos se utilizó la proporción 1:5. La mezcla de ligación se incubó a 65°C durante 5 minutos y posteriormente, en hielo, se añadió 1/10 del volumen final de tampón de ligación y 1 U de la ligasa de T4 (Roche). La mezcla se incubó toda la noche a 4°C (extremos cohesivos) o a temperatura ambiente (extremos romos). Los productos de la reacción se usaron para transformar células competentes de *E. coli* mediante el método del TSS (**Apartado 8.2.2**).

Para clonar productos de PCR se usaron los vectores pGEM-T *Easy* y pMBL, realizando la ligación según las recomendaciones del fabricante (Promega y MBL Dominion, respectivamente). El sitio de clonación múltiple de estos plásmidos interrumpe la secuencia génica del fragmento aminoterminal ( $\alpha$ ) de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, lo que facilita la selección de recombinantes mediante el empleo de X-gal.

### 7.3. PURIFICACIÓN DEL ADN MEDIANTE EXTRACCIÓN FENÓLICA.-

La fenolización del ADN se empleó para eliminar la contaminación proteica y facilitar las reacciones que se fueran a realizar con el ADN recién digerido. Para ello, el volumen de la muestra se llevó hasta 100  $\mu$ L con H<sub>2</sub>O, se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) y se agitó la muestra hasta obtener una emulsión. Se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 5 minutos y se recuperó la fase acuosa superior. Se añadió un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v/v), se agitó la mezcla y se volvió a centrifugar a 13000 r.p.m. durante 5 minutos. Finalmente, el ADN purificado se precipitó con etanol absoluto.

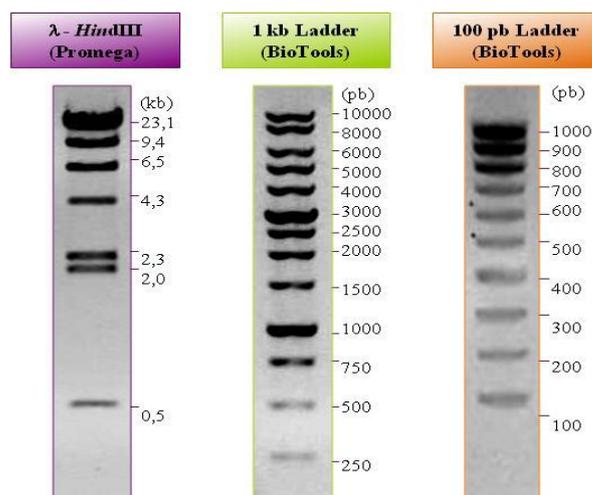
## Material y Métodos

### 7.4. PRECIPITACIÓN DEL ADN.-

La precipitación del ADN se realizó mediante el procedimiento descrito por Maniatis (Maniatis *et al.*, 1982). Se añadió acetato potásico 3M en una proporción 1/10 respecto al volumen en el que se encontraba disuelto el ADN y, al volumen resultante, se le añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto frío. La precipitación del ADN se favoreció manteniendo la mezcla durante al menos 2 horas o, más frecuentemente, toda la noche a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 20 minutos y el precipitado obtenido se lavó con etanol 70% frío, se secó y se resuspendió en agua estéril. Las muestras de ADN se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 7.5. ELECTROFORESIS DEL ADN.-

La electroforesis de ADN se realizó en geles preparados en **tampón TAE 0,5X** con un porcentaje de agarosa del 0,8 al 2 % (m/v) en función del tamaño de los fragmentos de ADN que se quisieron visualizar (Maniatis *et al.*, 1982) y a los que se añadió el agente intercalante y fluorescente bromuro de etidio a una concentración de  $0,5 \mu\text{g/mL}$ . Una vez que los geles hubieron solidificado, las muestras de ADN se mezclaron con el **tampón de carga** y se añadieron a los pocillos del gel. Como patrones de referencia se usaron el ADN del fago lambda digerido con *Hind*III (Promega) y los marcadores de peso molecular de 1 kb y 100 pb (BioTools) según interesara (**Figura M1**).



**Figura M1.-** Marcadores de peso molecular empleados como patrones de referencia en los geles de electroforesis de ADN en esta Tesis.

La electroforesis se realizó en cubetas horizontales Mupid-21 (Cosmo Bio) con tampón TAE 0,5X aplicando voltajes de entre 50 V y 135 V durante 15-30 minutos. Los geles se visualizaron en un equipo transiluminador de luz UV (260 nm) con el

sistema fotográfico digital Gel Doc 2000 (Bio-Rad) acoplado. Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa informático *Quantity One* (Bio-Rad). La estimación de los pesos moleculares de las bandas observadas se realizó comparando la migración de las mismas con las del marcador utilizado.

### TAMPÓN TAE

Tris HCl	30 mM
EDTA 0,5 M pH 8,0	0,002 % (v/v)
Ácido acético glacial	0,00114 % (v/v)
El pH se ajustó a 8,0.	

### TAMPÓN DE CARGA DE ADN

Azul de bromofenol	0,25% (m/v)
Xileno cianol FF	0,25 % (m/v)
Glicerol	30% (v/v)

#### 7.5.1. ELECTROFORESIS DE PLÁSMIDOS DE ALTO PESO MOLECULAR.-

Se siguió el método descrito por Eckhardt (1978). Las bacterias se cultivaron en medio TY líquido y, una vez alcanzada una D.O. a 480 nm de 0,2-0,3, se tomaron 500  $\mu$ L de cultivo y se centrifugaron a 12000 r.p.m. durante 4 minutos. El sedimento de células se lavó dos veces con **tampón TBE** y se resuspendió en 25  $\mu$ l de **tampón de carga**. Las muestras se mantuvieron en hielo y se cargaron en un gel de agarosa preparado al 0,5 % (m/v) en tampón TBE 1X y con la particularidad de tener una banda de agarosa al 0,4 % (m/v) con SDS al 15 % (m/v) en la pared posterior de los pocillos, más próxima al polo negativo del tanque. Con esto se consiguió la lisis *in situ* de las bacterias durante la electroforesis. Ésta se realizó en cubetas horizontales DNA Sub Cell™ (Bio-Rad). Se aplicó un voltaje de 20 V durante 30 minutos y de 100 V durante las 3 ó 4 horas siguientes. Transcurrido ese tiempo, los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (1 mg/mL), se lavaron con agua e, inmediatamente, se observaron y fotografiaron en un equipo transiluminador de luz UV (260 nm) con el sistema fotográfico digital Gel Doc 2000 (Bio-Rad) acoplado. Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa informático *Quantity One* (Bio-Rad).

### TAMPÓN TBE

Trizma base	90 mM
Ácido bórico	90 mM
EDTA	2 mM
El pH queda ajustado a 8,3.	

## Material y Métodos

### TAMPÓN DE CARGA

Tris-Ficoll	
(Ficoll al 12,5% (m/v) en Tris-HCl 25 mM pH 8,0)	450 µL
Lisozima <sup>a</sup> (6 mg/ 250 µL H <sub>2</sub> O)	125 µL
ARNasa	
(400 µg/mL en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 15 mM)	25 µL
Azul de bromofenol	
(0,55% (m/v) en Tris-Ficoll al 12,5% (m/v), pH 8,0)	50 µL

a. La solución de lisozima se preparó en el momento de su uso.

### 7.6. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.-

Tras la electroforesis en geles de agarosa, se recortaron las bandas deseadas y se purificó el ADN mediante el kit NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II (Macherey-Nagel) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Cuando interesó purificar bandas de ADN de tamaño comprendido entre 2,5 kb y 20 kb se empleó el kit NucleoTrap<sup>®</sup> CR de la misma casa comercial.

### 7.7. HIBRIDACIÓN ADN/ADN.-

Se empleó un sistema de hibridación no radiactivo basado en la formación de híbridos entre moléculas de ADN digeridas y moléculas de ADN sonda marcadas con digoxigenina. La detección de los híbridos formados se realizó por enzimoimmunoensayo, empleando el anticuerpo antidigoxigenina conjugado con la enzima fosfatasa alcalina. Esto permitió detectar la sonda, unida al ADN digerido, por reacción colorimétrica sobre el mismo filtro de la hibridación.

#### 7.7.1. PREPARACIÓN DE LA SONDA.-

Los fragmentos de ADN utilizados como sonda fueron obtenidos y marcados de forma aleatoria con digoxigenina mediante la técnica de la PCR convencional (**Apartado 7.8.1**). Se añadieron a la mezcla de reacción dNTP marcados con digoxigenina (DIG-dUTP) para que fueran incorporados al azar en las nuevas moléculas de ADN que se generaban a medida que la reacción progresaba. Siempre se incluyó un control positivo sin DIG-dNTP y un control negativo sin ADN (**Tabla 4**). El resultado se verificó visualizando una alícuota del ADN obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa (**Apartado 7.5**). El ADN sonda se conservó a -20°C hasta su uso.

**Tabla M4.-** Composición de las muestras empleadas en el marcaje de sondas con digoxigenina mediante PCR convencional.

	<b>Sonda</b>	<b>Control +</b>	<b>Control -</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	37,5	15,7	16,3
<b>Cebador F</b>	1	0,4	0,4
<b>Cebador R</b>	1	0,4	0,4
<b>dNTP</b>	1	0,4	0,4
<b>DIG-dNTP</b>	2		0,4
<b>Tampón 10x</b>	5	2	2
<b>Taq polimerasa</b>	0,4	0,1	0,1
<b>ADN</b>	2	1	
<b>Volumen final</b>	50	20	20

Los volúmenes se indican en µL.

### **7.7.2. TRANSFERENCIA DEL ADN AL FILTRO DE NYLON.-**

El ADN digerido se separó por electroforesis en un gel de agarosa junto a un marcador de peso molecular adecuado marcado con digoxigenina (Roche). Tras la electroforesis, el gel se sumergió durante 20 minutos en una solución de ácido clorhídrico 0,25 M en agitación para la despurinización parcial del ADN. Después se lavó varias veces con agua destilada y se mantuvo en **solución de desnaturalización** durante 10 minutos en agitación. A continuación, el ADN del gel se transfirió a un filtro de nylon (Hybond-N suministrado por Amersham Biosciences) por capilaridad durante 18 horas empleando la **solución de transferencia alcalina** según las indicaciones de Southern (1975). Una vez transferido el ADN, el filtro se sumergió en una solución de **SSC 2X** durante 5 minutos (sin agitación, pues el ADN aún estaba unido covalentemente al filtro), se secó a temperatura ambiente y se fijó el ADN mediante exposición a luz UV (260 nm) durante 2 minutos.

#### **SSC 20X**

NaCl 3M  
 Citrato sódico 0,3M  
 El pH se ajustó a 7,0.

#### **SOLUCIÓN DE DESNATURALIZACIÓN**

NaCl 1,5 M  
 NaOH 0,5 M

## Material y Métodos

### SOLUCIÓN DE TRANSFERENCIA ALCALINA

NaCl	1,5 M
NaOH	0,25 M

#### 7.7.3. HIBRIDACIÓN CON LA Sonda MARCADA.-

El ADN transferido al filtro de nylon se hibridó con una sonda de ADN previamente marcada con digoxigenina (**Apartado 6.8.1**). Siempre se cargó en el gel 1  $\mu\text{L}$  de la misma sonda diluída 1/10 en agua estéril como control de hibridación.

##### 7.7.3.1. PREHIBRIDACIÓN.-

El filtro se prehibridó incubándolo, en función de su tamaño, en 10-15 mL de **solución de prehibridación** que contenía formamida y 100-200  $\mu\text{L}$  de ADN de esperma de salmón (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Sigma) previamente desnaturalizado por calor (10 minutos a 95°C y 5 minutos en hielo para evitar la renaturalización). Así se mantuvo de 1 a 3 horas en agitación a 42°C en condiciones de homología o bien, a 28, 32 ó 37°C en condiciones de heterología.

### SOLUCIÓN DE PREHIBRIDACIÓN

SSC 20X	100 mL
SDS 20 % (m/v)	0,4 mL
Reactivo de bloqueo (Roche) <sup>a</sup>	20 g
Sal sódica de <i>N</i> -laurilsarcosina	0,4 g
H <sub>2</sub> O Milli-Q	100 mL

a. El reactivo de bloqueo se disolvió con agitación magnética y calor, añadiendo el mismo volumen de formamida desionizada (Applichem), y se conservó a -20°C hasta su uso.

##### 7.7.3.2. HIBRIDACIÓN.-

La sonda (unos 45  $\mu\text{L}$ ) se diluyó en 1 mL de solución de prehibridación y se desnaturalizó por calor sometiéndola a 95°C durante 10 minutos y posteriormente se mantuvo durante 5 minutos en hielo. El filtro, al que se le retiró la anterior solución de prehibridación, se incubó durante toda la noche con esta nueva solución a 42°C en condiciones homología o bien, a 37°C en condiciones de heterología.

##### 7.7.4. ELIMINACIÓN DE LA Sonda NO UNIDA.-

El filtro se lavó de forma rápida con una solución de SSC 2X y SDS 0,1 % (m/v). Después se realizaron diferentes lavados según las condiciones de estringencia escogidas. Así, para condiciones de homología, el filtro se lavó dos veces más con la

solución de SSC 2X y SDS 0,1 % (m/v) durante 5 minutos a temperatura ambiente, después se lavó dos veces con una solución de SSC 1X y SDS 0,1 % (m/v) durante 5 minutos a temperatura ambiente y, por último, dos veces con una solución de SSC 0,1X y SDS 0,1 % (m/v) durante 15 minutos a 68°C. Para condiciones de heterología se evitaron los lavados intermedios con la solución de SSC 1X y SDS 0,1 % (m/v), manteniéndose los demás.

### 7.7.5. DETECCIÓN INMUNOLÓGICA DE LA SONDA.-

El filtro se sumergió brevemente en **tampón 1** con agitación suave para eliminar los restos de SDS. Después se introdujo en una bolsa de hibridación con 15 mL de **tampón 2** y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos. Se retiró el **tampón 2** de la bolsa y se añadieron 10 mL de **tampón 2**, que contenía el anticuerpo anti-digoxigenina (0,75 U/ $\mu$ l) en proporción 1:5000 (anticuerpo:tampón 2), y se incubó en agitación suave durante 30 minutos. Tras este tiempo, se realizaron dos lavados de 15 minutos con **tampón 1** para eliminar el anticuerpo no fijado. El filtro se equilibró con **tampón 3** durante 5 minutos. Por último, se procedió al revelado del filtro promoviendo la reacción colorimétrica de la fosfatasa alcalina al añadir, en bolsa herméticamente sellada, 10 mL de **solución de revelado**. La bolsa se mantuvo en condiciones estáticas y oscuridad hasta visualizar la aparición de las bandas. La reacción se detuvo sumergiendo el filtro 10 minutos en agua destilada y posteriormente se secó a temperatura ambiente para conservarlo.

#### TAMPÓN 1

Tris-HCl pH 8,0	100 mM
NaCl	150 mM

#### TAMPÓN 2

Reactivo de bloqueo <sup>a</sup> (Roche) al 2 % (m/v) en tampón 1

a. El reactivo de bloqueo se disolvió con agitación magnética y calor. El tampón 2 se conservó a 4°C hasta su uso.

#### TAMPÓN 3

Tris-HCl pH 9,5	80 mM
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM

Se preparó en el momento de su uso.

## Material y Métodos

### SOLUCIÓN DE REVELADO

NBT (50 mg/mL en DMF al 70%)	66 µL
BCIP (100 mg/mL en DMF al 100%)	66 µL
Tampón 3	10 mL

### 7.8. AMPLIFICACIÓN DEL ADN MEDIANTE PCR.-

Para amplificar determinados genes o zonas génicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se empleó ADN bacteriano como molde siguiendo la metodología descrita por Saiki (1990).

#### 7.8.1. REACCIONES DE PCR CONVENCIONAL.-

Para amplificar fragmentos de ADN de hasta 3 kb de tamaño se usó la PCR convencional. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador 2720 *Thermal Cycler* (Applied Biosystems). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 20 µl ó 50 µl dependiendo del uso final del producto amplificado. La mezcla de reacción contenía la pareja de cebadores a una concentración de 0,1 µM cada uno, los dNTP a una concentración de 0,2 mM, tampón de PCR 10X (KCl 500mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, Tris-HCl 100 mM), 0,1 U de la enzima *Taq*-polimerasa (Amersham Pharmacia) y el ADN molde. En ocasiones, la reacción de PCR se realizó empleando biomasa bacteriana procedente de una colonia. En estos casos, una pequeña porción de biomasa se suspendió en 100 µl de agua bidestilada estéril y se añadió una alícuota de 1-2 µl como ADN molde a la mezcla de reacción.

Los programas de amplificación empleados consistieron en una desnaturalización inicial del ADN a 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación. Cada ciclo comprendía una desnaturalización del ADN a 95°C durante 30 segundos, una fase de unión de los cebadores al ADN de cadena simple durante 30 segundos a la temperatura indicada por el fabricante de los cebadores (Tib Molbiol) y una fase de polimerización del ADN a 72°C, variando el tiempo de polimerización en función del tamaño del fragmento a amplificar (1minuto/kb). Finalmente, se incluyó un último paso de extensión del ADN a 72°C durante 5 minutos para completar la síntesis de los fragmentos no acabados. El producto amplificado o amplicón se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa.

Para la amplificación eficiente de fragmentos génicos de tamaño superior a 3 kb se empleó el sistema de PCR “Expand Long Template PCR System” (Roche). Para

obtener una alta fidelidad en la secuencia amplificada se empleó el sistema “Expand High Fidelity PCR System” (Roche). En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante.

### 7.8.2. REACCIONES DE RT-PCR CUANTITATIVA.-

La PCR en Tiempo Real permite detectar y medir la acumulación del amplicón a medida que la reacción de PCR progresa gracias a la incorporación en la mezcla de reacción de un compuesto fluorescente, en este caso SYBR® Green I, que se une de forma inespecífica al ADN de doble cadena. El aspecto cuantitativo se basa en que la cantidad de ADN amplificada, y por ello, la cantidad de fluorescencia detectada durante la fase exponencial de la reacción de PCR, es directamente proporcional a la cantidad de ADN molde.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador *MJ MiniOpticon™* de Bio-Rad. El “software” adscrito al termociclador representó el incremento de fluorescencia en función del ciclo de reacción de PCR y estableció una línea umbral (threshold) a partir de la cual, la emisión de fluorescencia comenzó a ser detectada. El punto de corte entre la curva de amplificación y la línea umbral se define como ciclo umbral ó  $C_q$  (quantification cycle) para cada muestra (<http://www.rdml.org>). Cuanto mayor sea la concentración de la molécula molde, el número de ciclos necesarios para detectar la fluorescencia debida a la amplificación será menor y por tanto, menor será el valor de  $C_q$ . La eficiencia de la reacción se calculó mediante la construcción de una recta patrón. Ésta se obtuvo representando los valores de  $C_q$  frente al logaritmo decimal de cantidades de ADN correspondientes a diluciones seriadas del ADN molde. Se consideró una amplificación óptima aquella en la que la recta patrón presentó valores de pendiente comprendidos entre  $-3,3$  y  $-3,8$  (eficiencias de reacción comprendidas entre 105 y 90 % [ $E = 10^{-1/\text{pendiente}} - 1$ ]) y un coeficiente de regresión ( $R^2$ ) superior a 0,98 (Bio-Rad Laboratories, 2005).

Las reacciones se realizaron por triplicado en un volumen total de 20  $\mu\text{l}$ , que contenía 0,2  $\mu\text{M}$  de cebadores específicos, 10  $\mu\text{l}$  de PCR Master Mix con SYBR Green I (Bio-Rad) y como molde ADNc, resultado de retrotranscribir ARN. El protocolo consistió en una primera fase de 10 minutos a 95 °C para activar la enzima *Taq* polimerasa, seguidos de 42 ciclos, en los que cada ciclo incluía las mismas fases que en el protocolo seguido para la amplificación mediante PCR convencional. Finalmente se

## Material y Métodos

comprobó la especificidad del ensayo realizando una curva de disociación y, en ocasiones, analizando los productos de la reacción mediante electroforesis en gel de agarosa. Los productos de la reacción se disociaron mediante un aumento gradual de la temperatura, desde una temperatura inicial de 50 °C (1 minuto) hasta una final de 95 °C (1 minuto) en incrementos de 1°C de 10 segundos de duración. Cuando se alcanzó la temperatura a la cual el fragmento amplificado se disociaba, se produjo una caída en la fluorescencia. Esta medida de temperatura (temperatura de fusión, T<sub>m</sub>) debía corresponderse, en cada experimento, con la temperatura teórica de alineamiento de los productos que se amplificaban en la reacción, que se calcula según la composición nucleotídica de cada secuencia. La existencia de un único pico en la curva de disociación debía corresponderse con una única banda en el gel de agarosa.

### 7.8.2.1. ANÁLISIS DE DATOS.-

Se empleó el método de Pfaffl para cuantificar de forma relativa la transcripción del gen problema en las distintas condiciones analizadas. Para la normalización de los datos se utilizó como gen de referencia un fragmento interno de 166 pb del gen del ARNr 16S en *R. tropici* CIAT899 (número de acceso en GenBank EU488752), cuya expresión no difirió de forma significativa en las distintas condiciones analizadas. La fórmula empleada para relativizar el nivel de expresión del gen problema en una condición respecto a su expresión en las condiciones control fue la siguiente:

$$\text{Ratio} = (E_{\text{gen problema}})^{Cq_{\text{control}} - Cq_{\text{condición}}} / (E_{\text{gen referencia}})^{Cq_{\text{control}} - Cq_{\text{condición}}}$$

donde **E** = eficiencia.

### 7.8.3. DISEÑO DE CEBADORES.-

Para el diseño de cebadores se utilizó el programa informático interactivo *GeneFisher* 2.0 (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/old.html>) teniendo en cuenta ciertas recomendaciones según el tipo de reacción de PCR al que estuvieran destinados.

#### 7.8.3.1. CEBADORES UTILIZADOS EN REACCIONES DE PCR CONVENCIONAL.-

Los cebadores utilizados para las reacciones de PCR convencional se diseñaron teniendo en cuenta que:

1. Su longitud estuviera comprendida entre 15 y 21 nucleótidos.

2. Su porcentaje de G+C estuviera comprendido entre 50-60%.
3. Su temperatura de fusión (Tm) estuviera comprendida entre 50-65°C.
4. Los cebadores no hibridaran entre sí.

Los cebadores usados para PCR convencional en esta Tesis se muestran en la **Tabla M5**.

**Tabla M5.-** Cebadores para PCR convencional utilizados en esta Tesis.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño del amplicón (pb)
Ara9143-F	5'- CTC ACC TGA GGA ACT CGA - 3'	50,6	1493
Ara9143-R	5'- GGT GCA GAC CTT CTA CGA - 3'	51,2	
CIATnodD-F	5'- CGG CAC GCA GCA TCA ATC TCA - 3'	64,9	650
CIATnodD-R	5'- TCA TGC TGA AGC CCT GCA CGA - 3'	64,8	
CP95	5'- TGC TGA CAG TGC CCT ATG AG - 3'	55,0	600
CP93	5'- GGT GAA CGC ATC CAT AAG - 3'	55,1	
GlnD-5	5'- ATG CAG ACG AAA AGA CAG GCG - 3'	59,8	2927
GlnD-3	5'- CTT GAC TAG GCT CAT GCG GC - 3'	61,4	
GlnDext-F	5'- CTG ACC ACA GGC GAT ATT CCA - 3'	58,5	3462
GlnDext-R	5'- GAA GAG GTT CGG AAA GCG GAA - 3'	60,9	
Kan-F	5'- CTT GGG TGG AGA GGC TA - 3'	51,2	900
Kan-R	5'- TGC CGA CGG ATT TGC A - 3'	57,2	
MviN-5	5'- GCC GCA TGA GCC TAG TCA AG - 3'	61,4	1600
MviN-3	5'- TGC GGG GCG AAG GAG CCT TG - 3'	65,5	
M13	5'- CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3'	57,0	*
OpAra9143-F	5'- TCT CTC TCG GAA TTG CCA A - 3'	54,4	7115
OpAra9143-R	5'- TGG AAC CGA TGA TCC TGA - 3'	52,6	
Tn5-F	5'- TAT ACA CAA GTA GCG TCC TGA ACG - 3'	59,0	*
Tn5-FR	5'- CGT TCA GGA CGC TAC TTG TGT ATA - 3'	59,0	*
16S-F	5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3'	57,0	1600
16S-R	5'- AAA GGA GGT GAT CCA GCC GCA -3'	57,0	

\*Se usaron las parejas M13-Tn5F y M13-Tn5FR. El tamaño del amplicón dependió de la longitud del inserto clonado en el vector pBluescript. Tm: temperatura de fusión.

### **7.8.3.2. CEBADORES UTILIZADOS EN REACCIONES DE RT-PCR.-**

Los cebadores utilizados para las reacciones de RT-PCR se diseñaron teniendo en cuenta que:

1. Su longitud estuviera comprendida entre 18 y 21 nucleótidos.
2. Su porcentaje de G+C fuera del 50-60 %.
3. No tuviera más de 3 C o G seguidas, ni acabase en C ni en G.

## Material y Métodos

4. Su temperatura de fusión ( $T_m$ ) estuviera comprendida entre 50-65°C.
5. Se evitara la complementariedad en los extremos 3' de ambos cebadores (para evitar la formación de dímeros de primers) y las estructuras secundarias.

Además se tuvo en cuenta que el amplicón:

1. Tuviera una longitud comprendida entre 150 y 200 pb para favorecer una alta eficiencia en su amplificación.
2. Se evitara la formación de estructuras secundarias.
3. No tuviera más de 4 bases iguales seguidas.
4. Su porcentaje de C+G fuera del 50-60 %.

Los cebadores para RT-PCR utilizados en esta Tesis se detallan en la **Tabla M6**.

**Tabla M6.**- Cebadores para RT-PCR utilizados en esta Tesis.

Nombre	Secuencia	$T_m$ (°C)	Tamaño del amplicón (pb)
BGV3-F	5'- AGG ACC GCA TTG TCG AA -3'	54,6	167
BGV3-R	5'- TCA CGG CCA AGA ATC CA -3'	54,8	
C8TTRT-F	5'- CCA ACA AGT TCA CGG TCA - 3'	53,1	174
C8TTRT-R	5'- AAA TCT TCT GGC CCA CCA - 3'	55,2	
MviNRT-F	5'- CGA TGC CGA GAA ATT CGA - 3'	55,3	190
MviNRT-R	5'- GCC GAA ATA GAT CGC GTA - 3'	52,6	
NodACIATRT-F	5'- ACT TCG TCT CAT CGC CTA - 3'	50,3	167
NodACIATRT-R	5'- GTT CGC GCA ATA CAG GAA - 3'	54,3	
16SCIATRT-F	5'- CCT TAC GGG CTG GGC TAC ACA - 3'	63,5	166
16SCIATRT-R	5'- TGT ACA AGG CCC GGG AAC GTA - 3'	63,2	

$T_m$ : temperatura de fusión.

### 7.9. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.-

Para calcular la concentración de ADN ó ARN de una muestra, se empleó el fluorómetro Qubit™ (Invitrogen™) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 7.10. RETROTRANSCRIPCIÓN.-

Tras la extracción de ARN (**Apartado 7.1.3**), el ADN genómico persistente se eliminó de las muestras usando el kit RNase-Free DNase Set (Qiagen). El ARN se retrotranscribió a ADNc usando el kit Quantitect (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El programa utilizado comprendió una primera fase de 10 minutos a 42°C, tras la cual se tomó una muestra para realizar una PCR control de eliminación del

ADN genómico, seguida de 30 minutos a 42°C para retrotranscribir y 3 minutos a 95°C para inactivar la retrotranscriptasa. El ADNc obtenido se utilizó como molde en reacciones de RT-PCR empleando los cebadores adecuados en cada caso.

### 7.11. SECUENCIACIÓN DEL ADN.-

La secuenciación de los fragmentos de ADN se realizó en los servicios de secuenciación de NewBio Technics (NBT). Como moldes, se utilizaron fragmentos de ADN purificados a partir de geles de agarosa (**Apartado 7.6**) o ADN plasmídico (**Apartado 7.1.2**).

### 7.12. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS DE ADN.-

Para la búsqueda de homologías en las bases de datos GenBank, EMBL y Protein Identification Resource, se usó el programa de comparación de secuencias BLAST, disponible en sus distintas versiones en la página web del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para la detección y localización de las dianas para enzimas de restricción se empleó el programa *NEBcutter 2.0*, disponible en la página web de New England BioLabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>). Para convertir secuencias de ADN a distintos formatos se empleó el programa *READSEQ Sequences Conversión* (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/readseq/>), y para la edición gráfica de las secuencias se usaron los programas *ApE-A Plasmid Editor 1.17* y *Redasoft Visual Cloning 3.2*.

## 8. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS.-

### 8.1. CURVAS DE CRECIMIENTO.-

El crecimiento de las estirpes bacterianas se analizó cultivándolas en medio TY, medio mínimo B<sup>-</sup> o medio mínimo RMM, este último con diferentes fuentes de nitrógeno según el caso. Para ello, se prepararon precultivos de los microorganismos en medio TY ó YM y, cuando alcanzaron una D.O. a 600 nm de 0,6 a 0,8, se diluyeron 100 veces en tubos con 5 mL del medio adecuado al que se añadió apigenina (1 µg/mL) o la cantidad de NaCl necesaria según interesara. Se inocularon tres tubos de 5 mL por cada condición de estudio y se midió la D.O. a 600 nm cada dos o cuatro horas hasta que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento. Se realizó un recuento del número de microorganismos viables en placas de TY al inicio y al final de cada ensayo.

## **Material y Métodos**

### **8.2. MÉTODOS DE TRANSFERENCIA DEL ADN A LAS BACTERIAS.-**

La transferencia de ADN plasmídico a las estirpes de *Rhizobium* se realizó mediante conjugación bacteriana. La transferencia de los plásmidos a las estirpes de *E. coli* se realizó mediante transformación.

#### **8.2.1. CONJUGACIÓN.-**

La conjugación se llevó a cabo mezclando en un tubo eppendorf, 800  $\mu$ L de un cultivo en fase exponencial de la estirpe de *Rhizobium* receptora cultivada en agitación durante 48 horas, con 200  $\mu$ L de un cultivo de la estirpe de *E. coli* donadora del plásmido y, cuando fue necesario, con 100  $\mu$ L de un cultivo de la estirpe de *E. coli* portadora del plásmido pRK2013, ambas cultivadas en condiciones estáticas durante 24 horas. Cuando se utilizó la estirpe donadora S17.1 de *E. coli* no fue necesario un plásmido coadyuvante al disponer esta estirpe de los genes de transferencia integrados en su cromosoma.

Esta mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 5000 r.p.m., lavando el precipitado con H<sub>2</sub>O para eliminar los restos de antibióticos usados en el cultivo de las bacterias. Tras retirar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril y se colocaron en forma de parche en una placa de medio sólido TY, que se incubó a 28°C durante 24 horas. La masa celular se recogió y resuspendió en 1 mL de H<sub>2</sub>O estéril ó de glicerol-peptona cuando interesó conservar la conjugación (-20°C). Se realizaron las diluciones apropiadas para sembrar placas de TY suplementadas con los antibióticos apropiados y seleccionar así las estirpes transconjugantes. Las colonias desarrolladas se purificaron hasta tres veces por sucesivas siembras en el mismo medio selectivo.

#### **8.2.2. TRANSFORMACIÓN.-**

El ADN plasmídico se transfirió a la estirpe DH5- $\alpha$  de *E. coli* según el método del TSS (Transformation and Storage Solution) descrito por Chung *et al.* (1989). Para ello, *E. coli* DH5- $\alpha$  se cultivó en medio LB líquido con el antibiótico adecuado y se diluyó 1/50 veces en medio líquido LB sin antibióticos. Se incubó a 37°C en agitación hasta que la D.O. a 600 nm estuvo comprendida entre 0,3 y 0,4. Entonces se transfirió 1 mL del cultivo a un vial, que se mantuvo 5 minutos en hielo, y se centrifugó durante 3 minutos a 11000 r.p.m. Las bacterias se resuspendieron en 75  $\mu$ L de medio LB estéril

frío, y se mantuvieron 5 minutos en hielo. A continuación se añadieron 75  $\mu\text{L}$  de **medio TSS 2X** frío, se mezcló todo suavemente, y se mantuvo otros 5 minutos en hielo a fin de obtener células competentes preparadas para su transformación. Se añadió el ADN del plásmido que se quería transferir y la mezcla se mantuvo en hielo durante al menos 30 minutos. A continuación, las células se sometieron a un choque térmico de  $42^{\circ}\text{C}$  durante 90 segundos, seguido de 5 minutos de incubación inmediata en hielo. Finalmente, se añadió 1 mL de medio LB y se incubó 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  para permitir la multiplicación de las células y la expresión de los marcadores de resistencia. En aquellos casos en que el plásmido transferido era resistente la gentamicina, el cultivo se incubó durante 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , añadiéndole gentamicina a una concentración de  $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$  tras la primera hora de incubación. Los transformantes se seleccionaron sembrando la transformación en placas de medio LB con los antibióticos adecuados.

### **MEDIO TSS 2X**

Triptona	8 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	5 g/L
Polietilenglicol	200 g/L
Dimetil sulfóxido (DMSO)	100 mL/L
MgSO <sub>4</sub> 1M	100 mL/L
Se ajustó el pH a 6,5.	

### **8.3. ENSAYOS DE ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA.-**

La medida de la actividad  $\beta$ -galactosidasa debida a la expresión del gen *lacZ* se empleó como medida indirecta de la expresión de los distintos genes de interés. Se llevó a cabo en células permeabilizadas siguiendo el método descrito por Miller (1972).

#### **8.3.1. ENSAYOS EN MEDIO LÍQUIDO.-**

Este ensayo se basa en la reacción colorimétrica en la que el ortohitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG), sustrato incoloro de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, es hidrolizado a galactosa y *o*-nitrofenol (ONP), cromóforo de color amarillo cuya concentración puede determinarse mediante espectrofotometría.

A partir de cultivos crecidos en fase exponencial, se inocularon 10  $\mu\text{L}$  en tubos que contenían 5 mL de medio YM con apigenina ( $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) o con NaCl 200 mM cuando se requería. Estos cultivos se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$  en agitación hasta alcanzar una D.O. a 660 nm de 0,15-0,3. Entonces, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de estos cultivos y se mezclaron con

## Material y Métodos

800  $\mu\text{L}$  de **tampón Z**, 20  $\mu\text{L}$  de cloroformo y 10  $\mu\text{L}$  de SDS al 0,1 % (m/v). Se agitaron vigorosamente durante 10 segundos para favorecer la permeabilización de las células y se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de ONPG (Sigma-Aldrich) preparado a 4 mg/mL en tampón Z, controlando el tiempo que éste estaba en contacto con el cultivo. La reacción se detuvo cuando se observó un tono amarillo, añadiendo 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M. Finalmente se midió la D.O. a 420 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La actividad  $\beta$ -galactosidasa en unidades Miller se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad } \beta\text{-galactosidasa U (Miller)} = \text{D.O.}_{420 \text{ nm}} \times 1000 / \text{D.O.}_{660 \text{ nm}} \times V \times t$$

Donde:  $V$  = volumen de cultivo (mL), y  $t$  = tiempo (minutos)

### TAMPÓN Z

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,68 g/L
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6,24 g/L
KCl	0,75 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g/L
El pH se ajustó a 7,0.	

### 8.3.1.1. ENSAYOS EN PLACAS DE MICROTÍTULO.-

Se siguió igualmente el método de Miller (1972), realizando los ajustes necesarios para adecuarse al volumen de los pocillos de las placas. Las bacterias se cultivaron en 200  $\mu\text{L}$  de medio YM en placas de microtítulo durante 2 días con agitación a 28°C. Cuando la D.O. a 660 nm alcanzó un valor próximo a 0,3, se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  de cada cultivo a una nueva placa y se les añadieron 100  $\mu\text{L}$  de tampón Z 2X, 2  $\mu\text{L}$  de SDS 0,1% (m/v) y 4  $\mu\text{L}$  de tolueno. A cada pocillo se le añadieron 40  $\mu\text{L}$  de ONPG para iniciar la reacción y 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M para detenerla. La D.O. se midió en un lector de placas Asys UVM 340 (Anthos Labtec Instrument). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se confirmaron realizando el ensayo en tubos con 5 mL de medio líquido.

### 8.3.2. ENSAYOS EN MEDIO SÓLIDO.-

Los ensayos se realizaron en placas de Petri incorporando al medio de cultivo 32  $\mu\text{g/mL}$  del galactósido X-gal (USB) preparado a una concentración de 20 mg/mL en *N*-dimetilformamida. Este compuesto, al hidrolizarse por acción de la  $\beta$ -galactosidasa,

libera un producto de color azul que precipita en las colonias en formación. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### 8.4. DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS.-

Se desarrolló un nuevo método tomando como base el método más empleado para la detección de sideróforos (Schwyn & Neilands, 1987). Para evitar la inhibición del crecimiento de las bacterias producida por el HDTMA presente en el medio CAS, se evitó el contacto directo de los microorganismos con el medio. Las bacterias se cultivaron en medio mínimo B<sup>-</sup> líquido libre de hierro a 28°C en agitación. Una vez alcanzada una D.O. a 600 nm de 0,5, los cultivos se centrifugaron durante 5 minutos a 11000 r.p.m. y los sobrenadantes se filtraron dos veces (0,2 µm de diámetro de poro) para asegurar la eliminación de las células. Se tomaron 200 µL de estos sobrenadantes y se colocaron en pocillos de 0,7 mm de diámetro realizados con torrecillas de acero en un medio sólido con el indicador cromo-azurol S (CAS). Las placas se incubaron a 28°C durante 3 días. Cuando un quelante con gran afinidad por el Fe<sup>3+</sup>, como los sideróforos, extrae el hierro unido al indicador CAS, éste vira del color azul al amarillo-anaranjado formando un halo alrededor del pocillo (prueba positiva). Para obtener una cuantificación aproximada y relativa de la producción de sideróforos se midió el diámetro del halo anaranjado producido alrededor de los pocillos.

#### MEDIO CAS (Alexander & Zuberer, 1991)

Cromo-azurol S	60,5 mg/L
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O 1 mM, HCl 10 mM	10 mL/L
HDTMA	72,8 mg/L
PIPES	30,2 g/L
Agar	15 g/L
Solución MM9 <sup>a</sup>	100 mL/L
Glucosa	20 g/L
Extracto de levadura	0,1 g/L

En 50 mL de agua tipo Milli-Q se disolvió el CAS y se le agregaron los 10 mL de Cl<sub>3</sub>Fe·6H<sub>2</sub>O 1 mM disuelto en HCl 10 mM. El resultado es una mezcla de color violeta oscuro, que se añadió lentamente a 40 mL de una solución acuosa de HDTMA.

En 750 mL de agua tipo Milli-Q se disolvieron los 30,2 g de PIPES, y se ajustó el pH a 6,8 con NaOH 10 N. Se añadieron los 15 g de agar.

## Material y Métodos

Ambas soluciones se esterilizaron por separado en autoclave a una atmósfera de sobrepresión (121°C) durante 20 minutos, y se dejaron enfriar a 50°C. Se mezclaron una con la otra y a continuación con la solución MM9.

- a. La solución MM9 se esterilizó por separado en autoclave y, posteriormente, se le añadió la glucosa al 20% (m/v) esterilizada por filtración (0,45 µm de diámetro de poro). Su composición es la siguiente:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	17,1 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	12,8 g/L
NaCl	0,50 g/L
NH <sub>4</sub> Cl	1 g/L

### 8.5. PRUEBA BIOQUÍMICA DE LA NITRATO REDUCTASA.-

Se investigó si la bacteria reduce nitrato a nitrito. Para ello, las bacterias se cultivaron en medio TY líquido hasta fase estacionaria. Cuando la D.O. a 600 nm fue de 1,2, se tomaron alícuotas de estos cultivos y se les añadió ácido sulfanílico y α-naftilamina. La aparición de color rojo indicó la reacción de ambos compuestos con los nitritos (reacción positiva). En caso de reacción negativa, para confirmar la presencia de nitratos en el medio se añadió zinc en polvo, que reduce los nitratos a nitritos dando un color rojo. Cuando no hubo cambio de color tras la adición del zinc, se consideró que la reducción de los nitratos fue completa, pasando por nitritos a nitrógeno gaseoso N<sub>2</sub> o a una amina anaerógena.

### 8.6. ENSAYOS DE MOVILIDAD.-

Las bacterias se cultivaron a 28°C en agitación en aquel medio líquido en el que todas las estirpes a estudiar crecieran adecuadamente y de forma similar. Para analizar la movilidad de tipo “swimming” de las bacterias, cuando los cultivos alcanzaron una D.O. a 600 nm de 0,8, se inocularon 3 µL en medio YM diluido 1/10 con agar al 0,3% (m/v). Las placas se incubaron en oscuridad a 28°C durante 3 días envueltas en film para evitar su deshidratación. Transcurrido ese tiempo se midió el diámetro del halo máximo formado por las bacterias al migrar por la trama del agar desde el punto de inoculación.

### 8.7. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE AUTOINDUCTORES (AHL).-

Las bacterias se cultivaron en 5 mL del medio líquido adecuado a 28°C en agitación hasta que alcanzaron una D.O. a 600 nm de 0,3. Transcurrido ese tiempo, los

cultivos se diluyeron a la mitad en agua destilada estéril y se centrifugaron a 11000 r.p.m. durante 5 minutos. De este modo se redujo la interferencia del EPS en la sedimentación de las células. A continuación los sobrenadantes se filtraron con filtros de 0,2  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

La producción de AHL de las distintas estirpes se analizó de forma cuantitativa realizando un ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en la estirpe indicadora NT1[pZLR4] de *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria se cultivó a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 20 horas en agitación en 2 mL de medio YM con gentamicina (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) al que se añadieron 500  $\mu\text{L}$  [20% (v/v)] de los sobrenadantes obtenidos. Como control positivo se consideró la actividad  $\beta$ -galactosidasa de *A. tumefaciens* NT1[pZLR4] cultivada en 2 mL de medio YM con gentamicina, 3  $\mu\text{L}$  de oxo-hexanoil-homoserina lactona (OHHL) (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y 500  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Como control negativo se consideró la actividad  $\beta$ -galactosidasa basal de *A. tumefaciens* NT1[pZLR4] cultivada en 2 mL de medio YM con gentamicina y 500  $\mu\text{L}$  de agua destilada.

## 9. ESTUDIO DE LOS FACTORES NOD.-

### 9.1. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA EN FASE REVERSA (CCF-R).-

Para analizar el perfil cromatográfico de los factores Nod producidos por las distintas estirpes se siguió el método descrito por Spaink *et al.* (1992). Se prepararon precultivos de las bacterias en medio mínimo B<sup>-</sup> o RMM, añadiendo NaCl 300 mM para el estudio de los factores Nod sintetizados bajo estrés salino. Los precultivos se incubaron en agitación a  $28^{\circ}\text{C}$  hasta que alcanzaron una D.O. a 600 nm entre 0,2 y 0,4. Entonces se diluyeron 10 veces en 1 mL del mismo medio, al que se añadió apigenina (salvo en los controles negativos) a una concentración final de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y *N*-acetil-D-[1- $^{14}\text{C}$ ]-glucosamina con una actividad final de 0,2  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ . Estos cultivos se incubaron en agitación a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas (o el tiempo necesario para observar turbidez). A continuación se centrifugaron durante 15 minutos a 13000 r.p.m., se descartaron las células y se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de *n*-butanol saturado con agua a los sobrenadantes. Esta mezcla se incubó en agitación a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Se centrifugó para recuperar la fase butanólica, que se evaporó en una centrífuga de vacío Speed-Vac<sup>TM</sup> Savant. El precipitado resultante se resuspendió en 40  $\mu\text{L}$  de *n*-butanol saturado con agua y se aplicaron 10  $\mu\text{L}$  de cada una de estas muestras en puntos equidistantes en cromatoplasas de sílica RP-18 F<sub>254s</sub> de 10 x 10 cm (Merck). La separación de los factores Nod se llevó

## Material y Métodos

a cabo durante aproximadamente 40 minutos, empleando como fase móvil una mezcla polar de acetonitrilo:agua (AcN:H<sub>2</sub>O 1:1, v/v) preparada en el momento de su uso. Las placas se expusieron sobre películas radiográficas Fuji BAS-III durante al menos tres días y se digitalizaron utilizando el sistema *Phosphor-image* (Fuji).

### 9.2. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS FACTORES NOD.-

Se llevó a cabo en colaboración con el Grupo de Investigación dirigido por el Profesor Gil Serrano (Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla).

Se prepararon muestras a partir de 3 litros de cultivo. A partir de tubos con 5 mL de cultivo en medio TY de la bacteria a estudiar se inocularon 2,5 mL en matraces que contenían 100 mL de medio mínimo B<sup>-</sup>, suplementado con apigenina (1 µg/mL) o con NaCl 300mM salvo controles negativos, y se incubaron a 28°C en agitación durante 3 días. Cuando la D.O. a 600 nm alcanzó un valor de 0,6 - 0,8 se trasvasó el contenido de los matraces a otros que contenían 900 mL del mismo medio y se incubaron a 28°C en agitación hasta fase exponencial tardía. La extracción de los factores Nod se realizó, tras retirar las células por centrifugación, añadiendo 300 mL de *n*-butanol por litro de medio. La mezcla se mantuvo en agitación durante 12 horas y se dejó reposar al menos 24 horas más, hasta que se observó una buena separación de las fases acuosa y butanólica. A continuación se recogió la fase butanólica (superior), que contenía los factores Nod, y se concentró en un rotavapor a 45°C.

La purificación de los factores Nod para su posterior análisis mediante HPLC-MS/MS se realizó utilizando un cartucho de extracción en fase sólida (SPE C18 Resprep, Teknokroma). El cartucho se acondicionó con 2 mL de metanol y 2 mL de una disolución de acetonitrilo al 20% en H<sub>2</sub>O (v/v). Seguidamente la muestra se hizo pasar a través del relleno por aspiración, a un flujo aproximado de 5 mL/min. Las sales y otras moléculas muy polares se eliminaron por elución con una disolución acuosa de acetonitrilo al 20% (v/v). Finalmente se utilizaron 5 mL de metanol para eluir selectivamente los factores Nod de la columna. La fracción metanólica obtenida se concentró, liofilizó y resuspendió en 1 mL de acetonitrilo al 50% en H<sub>2</sub>O (v/v).

La muestra procedente de la extracción en fase sólida (50 µL) se sometió a fraccionamiento utilizando un cromatógrafo de HPLC equipado con una columna analítica en fase reversa (C18, 250 x 2,1 mm, Spherisorb ODS2, 5 µm, Tracer). La

elución se llevó a cabo usando como fase móvil un gradiente de acetonitrilo y agua (HCOOH 0,1%), con un flujo de 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  y el siguiente programa de elución: isocrático 30% AcN, 5 min; gradiente lineal de 30% a 100% AcN, 30 min e isocrático 100% AcN, 2 min. El seguimiento se realizó con un espectrómetro de masas QTRAP (Applied Biosystems AB Sciex.) empleando la función IDA (Information-Dependent Acquisition), que permite la adquisición *on-line* de espectros MS/MS durante el proceso cromatográfico.

### 10. ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS BACTERIANAS.-

#### 10.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.-

##### 10.1.1. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CELULAR.-

Las bacterias se cultivaron en matraces con 50 mL de medio mínimo B<sup>-</sup> al que se añadió apigenina (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ó NaCl 300 mM cuando fue necesario. Los cultivos se incubaron en agitación a 28°C hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 0,5-0,6. Entonces se centrifugaron a 4°C y 12000 r.p.m. durante 20 minutos. Las células se lavaron con 30 mL de **PBS** y se centrifugaron durante 15 minutos a 10000 r.p.m. y 4°C. Tras descartar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 600  $\mu\text{L}$  de **tampón de resuspensión** y se repartieron en viales de 150  $\mu\text{L}$  que se guardaron a -70°C hasta su uso.

##### TAMPÓN FOSFATO SALINO (PBS)

KCl	3 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
NaCl	68 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9 mM

##### TAMPÓN DE RESUSPENSIÓN

Tris-HCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Ditiotreitol (DTT)	0,5 mM
Fenilmetilsulfonil fluorido (PMSF)	0,5 mM

##### 10.1.2. LISIS CELULAR.-

Por cada 150  $\mu\text{L}$  de muestra se añadieron 450  $\mu\text{L}$  de **solución de lisis** y, tras homogeneizar bien, se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, la suspensión celular se sonicó 6 veces durante 10 segundos al 20% de amplitud (Ultrasonic Processor XL, Heat Systems), manteniéndola en hielo durante

## Material y Métodos

1 minuto entre los tratamientos. Una vez rotas las células, el extracto crudo se centrifugó 30 minutos a 14000 r.p.m. y 4°C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo eppendorf y se volvió a centrifugar durante 15 minutos a 14000 r.p.m. y 4°C. Finalmente las proteínas extraídas se cuantificaron mediante el método de Bradford y se conservaron a -70°C hasta su análisis.

### SOLUCIÓN DE LISIS

Urea	7 M
Tiourea	2 M
CHAPS	4%
DTT <sup>a</sup>	40 mM

a. El DTT se añadió en el momento del uso.

### 10.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.-

Se empleó el método descrito por Bradford (1976). Se tomaron 1 ó 2 µL de muestra y se llevaron hasta 100 µL con agua destilada. Se añadió 1 mL de **solución de Bradford 1X** y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación se midió la D.O. a 595 nm. En paralelo al tratamiento de las muestras, se realizó una curva patrón con concentraciones crecientes de la proteína albúmina de suero bovino (BSA) preparada a una concentración de 1 mg/mL.

### SOLUCIÓN DE BRADFORD 5X

Coomassie Brilliant Blue (G-250)	100 mg en 50 mL de etanol 95% (v/v)
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> al 85% (v/v)	100 mL

El volumen se ajustó hasta 200 mL con H<sub>2</sub>O y se filtró a través de papel Whatman 3MM.

### 10.3. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.-

#### 10.3.1. ELECTROFORESIS UNIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS.-

Se realizó en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) para separar las proteínas en función de su masa molecular siguiendo el método descrito por Laemmli (1970). Las proteínas se resuspendieron en tampón de muestra y se desnaturizaron por calor durante 5 minutos a 90°C. Posteriormente, se centrifugaron y el sobrenadante se cargó en el gel junto al marcador de masa molecular de proteínas Protein Ladder (Invitrogen) (**Tabla M7**). Se prepararon geles de poliacrilamida SDS-PAGE con distintas concentraciones de acrilamida dependiendo del tamaño de las proteínas que se

quisieron separar. El porcentaje de acrilamida en el gel osciló entre 7,5%, para las proteínas de mayor tamaño, y 15%, para las proteínas de menor tamaño, siendo el porcentaje del 12% el usado más comúnmente.

**Tabla M7.-** Marcador de amplio rango Protein Ladder (Invitrogen) usado para la determinación de las masas moleculares en los geles unidimensionales de proteínas.

<b>Proteína</b>	<b>pm (kDa)</b>	<b>Origen</b>
β - galactosidasa	116	<i>E. coli</i>
BSA	66,2	Plasma bovino
Ovoalbúmina	45	Huevo de gallina
Lactato deshidrogenasa	35	Músculo porcino
REase <i>Bsp</i> 981	25	<i>E. coli</i>
β - lactoglobulina	18,4	Leche bovina
Lisozima	14,4	Huevo de gallina

La electroforesis se desarrolló a 160V en **tampón de electroforesis 1X** en cubetas Mini Protean II (Bio-Rad) hasta que el colorante alcanzó el borde inferior del gel. Finalmente los geles se tiñeron con **azul de Coomassie** durante 20 minutos y, para digitalizarlos, se destiñeron previamente sumergiéndolos en H<sub>2</sub>O.

### Gel de separación

	<b>7,5%</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>15%</b>
Acrilamida/bisacrilamida 40% 29:1	1,875 mL	2,50 mL	3 mL	3,75 mL
H <sub>2</sub> O Milli-Q	5,48 mL	4,945 mL	4,35 mL	3,845 mL
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
SDS 10% (m/v)	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
APS 10% (m/v)	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
TEMED	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL

Los volúmenes indicados son adecuados para dos geles de 10 cm x 7,4 cm.

### Gel de empaquetamiento

Acrilamida/bisacrilamida 40% 29:1	487,5 mL
H <sub>2</sub> O Milli-Q	3,162 mL
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	1,30 mL
SDS 10% (m/v)	50 μL
APS 10% (m/v)	25 μL
TEMED	10 μL

Los volúmenes indicados son adecuados para dos geles de 10 cm x 7,4 cm.

## Material y Métodos

### TAMPÓN DE MUESTRA

Tris-HCl 50 mM pH 6,8	2 mL
SDS 10% (m/v)	3,2 mL
Glicerol	1,6 mL
□-mercaptoetanol 5% (v/v)	800 µL
Azul de bromofenol 0,05% (m/v)	400 µL
H <sub>2</sub> O	4 mL

### TAMPÓN DE ELECTROFORESIS 10X

Tris base	250 mM
Glicina	2,5 mM
SDS	1% (m/v)

### COLORANTE DE TINCIÓN

Coomassie Brilliant R250	0,275 g
Metanol	250 mL
Ácido acético	50 mL
Se completó con H <sub>2</sub> O hasta 550 mL.	

### 10.3.2. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS.-

La electroforesis bidimensional de proteínas ó 2D-PAGE (2D- Polyacrilamide Gel Electroforesis) resuelve mezclas complejas de proteínas separando sus componentes individuales en función de dos propiedades independientes, punto isoeléctrico y masa molecular, en dos pasos discretos o dimensiones en el espacio.

El primer paso o primera dimensión, isoelectroenfoque IEF (IsoElectric Focusing), separa las proteínas según su punto isoeléctrico, pI, utilizando gradientes inmovilizados de pH o IPG (Inmobilised pH Gradient). El segundo paso o segunda dimensión, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, separa las proteínas según su tamaño o masa molecular relativa  $M_r$ . Cada punto o “spot” en el gel bidimensional resultante corresponde potencialmente a una única especie de proteína de la muestra.

#### 10.3.2.1. ISOELECTROENFOQUE (IEF).-

Muestras con aproximadamente 400 µg de proteínas se transfirieron a un eppendorf y se añadió IPG al 2% y tampón Destreak o tampón de rehidratación con DTT 30 mM (GE Healthcare) hasta completar un volumen final de 250 µL en el vial. A continuación, la muestra se centrifugó durante 1 minuto a 10000 r.p.m. para eliminar las sales y, seguidamente, se aplicó en el sarcófago con cuidado de no atrapar burbujas. Sobre ella se colocó la tira de pH (13 cm, pH 3-10 ó pH 4-7) con el gel mirando hacia

abajo y respetando su polaridad. La tira se cubrió con aceite mineral (Dry Strip Cover Fluid) hasta completar el volumen de 1 mL en el sarcófago. Finalmente se realizó el IEF con el sistema Ettan™ IPGphor™ II (GE Healthcare), según el protocolo específico recomendado por el fabricante (**Tabla M8**). Se programó una rehidratación activa previa de las tiras mediante IEF a bajo voltaje (50 V) durante 12 horas aproximadamente. Una vez hubo terminado el IEF, las tiras se almacenaron inmediatamente a -70°C o se equilibraron para su uso.

**Tabla M8.-** Programa de IEF seleccionado para separar las muestras de proteínas.

<b>Modo</b>	<b>Voltaje (V)</b>	<b>Tiempo (h:min)</b>	<b>kV/h</b>
1. Step and hold	500	1:00	0,5
2. Gradient	1000	1:00	0,8
3. Gradient	8000	2:30	11,3
4. Step and hold	8000	0:25 - 0:55	3,3 - 7,4
<b>Total</b>	<b>20000</b>	<b>4:55 - 5:25</b>	<b>16,0 - 20,0</b>

### 10.3.2.2. EQUILIBRIO DE LAS TIRAS.-

Las tiras se sumergieron en 5 mL de **solución de equilibrio I** con DTT. Se homogeneizó con agitación muy suave durante 15 minutos y se reemplazó la solución de equilibrio I por la **solución de equilibrio II** con iodacetamida. Se homogeneizó con agitación suave durante otros 15 minutos y, finalmente, se descartó esta última solución.

#### TAMPÓN DE EQUILIBRIO

Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	75 mM
Urea	6 M
Glicerol	30% (v/v)
SDS	2% (v/v)
Azul de bromofenol	0,002% (m/v)

#### SOLUCIÓN DE EQUILIBRIO I

Tampón de equilibrio	5 mL
DTT <sup>a</sup>	50 mg

#### SOLUCIÓN DE EQUILIBRIO II

Tampón de equilibrio	5 mL
Iodacetamida <sup>a</sup>	175 mg

a. El DTT y la iodacetamida se añadieron en el momento del uso. Se agitó con cuidado hasta disolver completamente. Las cantidades que se indican se emplearon para el equilibrio de una sola tira.

## Material y Métodos

### 10.3.2.3. ELECTROFORESIS SDS-PAGE.-

Una vez equilibradas las tiras, se procedió a separar las proteínas en función de su tamaño mediante SDS-PAGE. Se prepararon los geles de poliacrilamida al 12,5% como se indica a continuación, cubriendo la superficie del gel con butanol-agua mientras polimerizaba y hasta su uso.

SDS-PAGE	
	12,5%
Acrilamida/biacrilamida 40% 29:1	25 mL
H <sub>2</sub> O Milli-Q	33,8 mL
Tris- HCl 1,5 M pH 8,8	20 mL
SDS 10%	800 µL
APS 10%	400 µL
TEMED	27 µL

Los volúmenes indicados son adecuados para preparar dos geles de 16 cm x 16 cm.

Antes de cargar el gel, se retiró el butanol de su superficie y se lavó bien con agua destilada. La tira se lavó durante 5 segundos en tampón de electroforesis y se colocó sobre el gel. Junto a ella se cargaron 10 µL del marcador de masas moleculares Amersham LMW Calibration kit (**Tabla M9**). La tira y el marcador se cubrieron con agarosa, preparada al 1% (m/v) en tampón Tris-HCl 1,5M pH 8,8 con SDS y azul de bromofenol, recién fundida. Cuando la agarosa hubo solidificado, los geles se colocaron en cubetas verticales Ruby (GE Healthcare), que contenían tampón de electroforesis. La corriente se limitó a 45 mA por gel y la electroforesis se detuvo cuando el colorante azul de bromofenol alcanzó el límite inferior del gel (3 ó 4 horas aproximadamente).

**Tabla M9.-** Componentes de la mezcla liofilizada de proteínas Amersham LMW Calibration kit (GE Healthcare) usada para la determinación de la masa molecular relativa en geles bidimensionales en presencia de SDS.

Proteína	Mr (x1000 Da)
Fosforilasa b	97
Albumina	66
Ovoalbúmina	45
Anhidrasa carbónica	30
Inhibidor tripsina	20,1
α - Lactalbúmina	14,4

### TAMPÓN DE ELECTROFORESIS

Tris base	25 mM
Glicina	0,25 mM
SDS	0,1% (m/v)

### 10.4. TINCIÓN DE LAS PROTEÍNAS CON AZUL DE COOMASSIE.-

Una vez concluida la electroforesis, el gel se sumergió en **solución de fijación** con agitación suave durante 24 horas. Tras retirar el fijador, se realizó la tinción manteniendo el gel durante al menos 16 horas con agitación suave en el **colorante Coomassie Blue coloidal**. Una vez transcurrido este tiempo, se destiñó manteniéndolo en H<sub>2</sub>O con agitación suave hasta que se visualizaron con nitidez los “spots” correspondientes a las distintas proteínas separadas.

### SOLUCIÓN DE FIJACIÓN

Ácido ortofosfórico (85%)	1% (v/v)
Metanol	20% (v/v)

### COLORANTE COOMASSIE COLOIDAL

Metanol	100 mL
Solución A <sup>a</sup>	400 mL
Solución B <sup>a</sup>	20 mL

- a. Solución A: Ácido ortofosfórico (85%) 2% (v/v) + sulfato de amonio 10% (m/v).  
Solución B: Coomassie Blue G250 2,5% (m/v)

### 10.5. ANÁLISIS DE LOS GELES BIDIMENSIONALES.-

Los geles teñidos con Coomassie fueron digitalizados con un escáner de alta resolución *ImageScanner* (GE Healthcare). Para la cuantificación y análisis de las manchas proteicas presentes en los geles 2-DE se empleó el software de análisis de geles bidimensionales *Image Master 2D Platinum* (GE Healthcare).

### 10.6. SECUENCIACIÓN DE LAS PROTEÍNAS.-

#### 10.6.1. DIGESTIÓN CON TRIPSINA EN GEL DE POLIACRILAMIDA.-

El “spot” o banda que contenía la proteína de interés se recortó del gel, se colocó en un tubo eppendorf y se preparó para su secuenciación según el método descrito por Shevchenko *et al.* (1996). Como control negativo se recortó un trozo de acrilamida del gel y como control positivo se recortó la proteína usada como patrón de masas moleculares. Para evitar que el colorante y el SDS interfirieran posteriormente en la digestión enzimática, los fragmentos de gel se decoloraron haciendo lavados con

## Material y Métodos

400  $\mu\text{L}$  de una solución de acetonitrilo 50% en  $\text{H}_2\text{O}$  (v/v) y bicarbonato de amonio 25 mM pH 8,0 en agitación suave. Una vez eliminado el colorante, los fragmentos se deshidrataron con 200  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo durante 5 minutos y se secaron completamente durante 15 minutos en Speed Vac ó al menos 1 hora a temperatura ambiente en la campana de flujo laminar. Posteriormente, los fragmentos se cubrieron con 10  $\mu\text{L}$  de una **solución de tripsina** recién preparada, se mantuvieron en hielo durante 30 minutos para que la tripsina penetrara en ellos, y se incubaron toda la noche (entre 16 y 24 horas) a 37°C desarrollándose la reacción enzimática. El sobrenadante de la digestión se pasó a un tubo limpio de 500  $\mu\text{L}$  y los péptidos se extrajeron con 20  $\mu\text{L}$  de una solución de ácido fórmico:acetonitrilo (5:50, v/v) durante 30 minutos en agitación. Se secaron las muestras en Speed Vac durante 1 hora, y se resuspendieron en 4  $\mu\text{L}$  de TFA al 0,1% (v/v). Las muestras se conservaron a -80°C hasta hacer el análisis por espectrometría de masas.

### SOLUCIÓN DE TRIPSINA

Tripsina (Promega)	10 ng/ $\mu\text{L}$
Bicarbonato de amonio	40 mM
Acetonitrilo	10% (v/v)

### 10.6.2. ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.-

La matriz de  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) se disolvió hasta una concentración de 5 mg/mL en una solución de acetonitrilo 50% (v/v) y TFA 0,1% (v/v). Se agitó vigorosamente durante 1 minuto y se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 5 minutos. Después se mezcló 1  $\mu\text{L}$  de sobrenadante con 1  $\mu\text{L}$  de cada muestra de péptidos eluidos. Se aplicó 1  $\mu\text{L}$  de cada una de estas mezclas y de la mezcla de calibración (**Tabla M10**) en una placa de MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) y las gotas se dejaron secar a temperatura ambiente.

**Tabla M10.-** Patrones MALDI empleados a una concentración final de 750 pmol/L en los análisis por espectrometría de masas.

	<b>Masa (kDa)</b>
ACTH 1-17	2093,0861
ACTH 1-24	2932,5878
ACTH 18-39	2465,1982
Somatostatina	1637,7238
Angiotensina I	1296,6847
Angiotensina II	1046,5417

Se realizó un análisis MALDI- TOF/TOF en un analizador Autoflex TOF/TOF (Bruker Daltonics). Se usaron los programas informáticos Flex Control y Flex Analysis (Bruker Daltonics) para obtener los espectros de MS y MS/MS que se rastrearon en las bases de datos generales del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante la aplicación informática Mascot (Matrix-Science). Del mismo modo se realizó un rastreo más específico frente a la base de datos de proteínas de *R tropici* CIAT899 cedida sin anotar por el grupo de investigación de la Profesora Esperanza Martínez de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M).

### **11. ESTUDIO DE LOS POLISACÁRIDOS SUPERFICIALES BACTERIANOS (SPS).-**

#### **11.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS EXOPOLISACÁRIDOS (EPS).-**

Se prepararon precultivos de las estirpes de interés en medio TY con los antibióticos necesarios y se incubaron a 28°C con agitación hasta fase estacionaria. Entonces se inocularon 100 µL de estos cultivos en botellas de 250 mL de volumen que contenían 100 mL del medio elegido para determinar la producción de EPS. Los cultivos se incubaron a 28°C en agitación durante 5 días. Transcurrido ese tiempo, se centrifugaron dos veces durante 20 minutos a 17000 r.p.m. para retirar las células. El sedimento celular se dejó secar a temperatura ambiente y se pesó. Por otra parte, se recuperó el sobrenadante y se le añadieron 3 volúmenes de acetona fría. Los EPS se recogieron con ayuda de una varilla, se secaron sobre un papel de filtro a temperatura ambiente y finalmente se pesaron. Se realizó un recuento del número de células viables inicial y final de cada cultivo. Igualmente se llevaron a cabo los controles de contaminación correspondientes.

##### **11.1.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.-**

Los resultados se analizaron con el programa Statistix for Windows Analytical Software, usando el análisis de la varianza (ANOVA). Para la comparación múltiple de las medias se empleó el test LSD (mínima diferencia significativa) de Fisher protegido, con un nivel de significación del 5%.

### **11.2. ANÁLISIS DE LOS LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS).-**

#### **11.2.1. EXTRACCIÓN DEL LPS.-**

Para la obtención de los LPS se siguió el método descrito por Köplin *et al.* (1993). Las bacterias se cultivaron en 5 mL de medio mínimo B<sup>-</sup>, al que se añadió

## Material y Métodos

apigenina (1 µg/mL) y/o NaCl 300 mM cuando fue necesario, a 28°C en agitación durante 3 días. Transcurrido ese tiempo se tomaron 1,5 mL de estos cultivos y se centrifugaron a 8000 r.p.m. durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en 1 mL de NaCl 0,9% (m/v), se centrifugaron de nuevo a 8000 r.p.m. durante 5 minutos y se lavaron tres veces más con NaCl 0,9%. Se eliminaron cuidadosamente los restos de NaCl y las células se lisaron añadiendo 125 µL de **tampón 1**, agitándolas vigorosamente e hirviéndolas durante 6 minutos. Las muestras se dejaron enfriar y se les añadieron 875 µL de **tampón 2** y se trataron con 3 µL de ARNasa (10 mg/mL) y 10 µL de ADNasa (1 mg/mL) incubándolas a 37°C durante 4 horas. A continuación se añadieron 15 µL de proteinasa K (10 µg/mL) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Este paso se repitió dos veces. Cuando se observó poca turbidez en la muestra, se tomaron 350 µL, se les añadió un volumen igual de **tampón de resuspensión** y se hirvió la mezcla durante 6 minutos. Finalmente, se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 7 minutos y se tomaron 600 µL del sobrenadante. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su carga en el gel.

### TAMPÓN 1

Tris-HCl	60 mM
SDS	2% (m/v)
EDTA pH 6,8	1 mM

### TAMPÓN 2

Tris-HCl	60 mM
EDTA pH 6,8	1 mM

### TAMPÓN DE RESUSPENSIÓN

Tampón 1	5,9 mL
Glicerol	4 mL
2-mercaptoetanol	0,8 mL
Azul de bromofenol	0,05% (m/v)

### 11.2.2. ELECTROFORESIS DEL LPS.-

La electroforesis de los LPS se realizó en un gel de poliacrilamida al 15% en un tanque Mini-Protean II (Bio-Rad). Se desarrolló a 200 V durante los primeros 10 minutos y a 175 V hasta que el colorante alcanzó el límite inferior del gel.

	Gel de empaquetamiento	Gel separador
Acrilamida/bisacrilamida 40% 37.5:1	375 µL	3,73 mL
H <sub>2</sub> O Milli-Q	2,35 mL	3,6 mL
Tris-HCl 1M pH 8,8		2,5 mL
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	945 µL	
SDS 10% (m/v)	37,5 µL	100 µL
APS 10% (m/v)	30 µL	66,6 µL
TEMED	4 µL	10 µL

Los volúmenes indicados son adecuados para preparar dos geles de 10 cm x 7,4 cm.

#### TAMPÓN DE ELECTROFORESIS DE LPS

Tris pH 8,3	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0,1% (m/v)

#### 11.2.3. TINCIÓN DEL LPS.-

Los geles de LPS se sumergieron en primer lugar en **solución de fijación** durante al menos 3 horas en agitación. Transcurrido ese tiempo, se eliminó la solución de fijación y los geles se mantuvieron en una **solución de oxidación** durante 10 minutos con agitación suave. Después se lavaron 5 veces con H<sub>2</sub>O (5 minutos cada lavado) y se tiñeron manteniéndolos en una solución de AgNO<sub>3</sub> al 0,1% (m/v) durante 30 minutos en total oscuridad. Tras un lavado breve con H<sub>2</sub>O, los geles se revelaron sumergiéndolos en **solución de revelado**. Cuando se detectaron las bandas de LPS se detuvo la reacción lavando los geles con abundante H<sub>2</sub>O. Finalmente se conservaron en Na<sub>2</sub>EDTA al 1,46% (m/v) en H<sub>2</sub>O.

#### SOLUCIÓN DE FIJACIÓN

Etanol absoluto	30% (v/v)
Ácido acético glacial	10% (v/v)

#### SOLUCIÓN DE OXIDACIÓN

Peryodato sódico 32,73 mM en solución de fijación

#### SOLUCIÓN DE REVELADO

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	3% (m/v)
Formaldehído al 37% (m/v)	0,35 µL/mL

## Material y Métodos

### 11.3. ANÁLISIS DE LOS POLISACÁRIDOS CAPSULARES TIPO ANTÍGENO K (KPS).-

#### 11.3.1. EXTRACCIÓN DEL KPS.-

Se siguió el método descrito por Fernández de Córdoba *et al.* (2008). Las bacterias de interés se cultivaron en 5 mL de medio mínimo B<sup>-</sup> con apigenina (1 µg/mL) y/o NaCl 300 mM en los casos necesarios, a 28°C en agitación durante 3 días. A continuación, se tomaron 1,5 mL de esos cultivos y se centrifugaron a 8000 r.p.m. durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en 1 mL de NaCl 0,9% (m/v), realizando posteriormente tres lavados más con NaCl 0,9%. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante en el último lavado y las células se resuspendieron en 250 µL de **tampón de KPS 1X** y se agitaron vigorosamente. A continuación se hirvieron durante 6 minutos, se agitaron vigorosamente y se dejaron enfriar. Se les añadieron 3 µL de ARNasa (10 mg/mL) y 10 µL de ADNasa (1 mg/mL) y se incubaron a 37°C durante 4 horas. Transcurrido ese tiempo se añadieron 15 µL de proteinasa K (10 µg/mL) en dos pasos sucesivos, incubándolas a 37°C durante 24 horas en cada tratamiento. Cuando se observó la pérdida de turbidez en las muestras, éstas se centrifugaron a 13000 r.p.m. durante 5 minutos, se tomaron 200 µL del sobrenadante y se les añadieron 340 µL de sacarosa 1M y 60 µL de etanol absoluto. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su uso. Antes de su carga en el gel, se añadieron 2 µL de una solución saturada de azul de bromofenol en H<sub>2</sub>O.

#### **TAMPÓN DE KPS**

Tris-HCl pH 8,5	50 mM
EDTA	13 mM
Ácido bórico	15 mM

#### 11.3.2. ELECTROFORESIS DEL KPS.-

La electroforesis de los KPS se realizó en geles de poliacrilamida al 18% en un tanque Mini Protean II (Bio-Rad) y se desarrolló a 200 V durante 45-60 minutos.

#### **TAMPÓN DE ELECTROFORESIS DE KPS**

Tris pH 8,3	25 mM
Glicina	192 mM
Etanol absoluto	10% (v/v)

	<b>Gel de empaquetamiento</b>	<b>Gel separador</b>
Acrilamida/bisacrilamida 40% 37.5:1	300 µL	4,5 mL
H <sub>2</sub> O Milli-Q	1,95 mL	1,61 mL
Tris-HCl 1M pH 8,8		2,5 mL
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	756 µL	
Etanol absoluto	300 µL	1 mL
APS 10% (m/v)	15 µL	41,7 µL
TEMED	3 µL	5 µL

Los volúmenes indicados son adecuados para preparar dos geles de 10 cm x 7,4 cm.

### **11.3.3. TINCIÓN DEL KPS.-**

Los geles se sumergieron en una **solución de azul alción** durante al menos 30 minutos con agitación suave. Transcurrido ese tiempo, se sumergieron en una **solución de fijación** con agitación suave durante al menos 3 horas, hasta que se eliminó el colorante. A continuación, se reemplazó la solución de fijación por una **solución de oxidación** en la que los geles se mantuvieron durante 10 minutos con agitación. Se realizaron 5 lavados de 5 minutos con H<sub>2</sub>O. Después los geles se tiñeron manteniéndolos en una solución de AgNO<sub>3</sub> al 0,1% (m/v) durante al menos 30 minutos en total oscuridad. Tras un lavado breve con H<sub>2</sub>O, los geles se revelaron sumergiéndolos en **solución de revelado**. La reacción se detuvo cuando las bandas de KPS se distinguieron con claridad lavando los geles con abundante H<sub>2</sub>O. Finalmente se conservaron en Na<sub>2</sub>EDTA al 1,46% (m/v) en H<sub>2</sub>O.

#### **SOLUCIÓN DE AZUL ALCIÁN**

Azul alción	0,5% (m/v)
Ácido acético glacial	2% (v/v)

#### **SOLUCIÓN DE FIJACIÓN**

Etanol	40% (v/v)
Ácido acético	5% (v/v)

#### **SOLUCIÓN DE OXIDACIÓN**

Peryodato sódico al 0,7% (m/v) en solución de fijación.

#### **SOLUCIÓN DE REVELADO**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	3% (m/v)
Formaldehído al 37% (m/v)	0,35 µL/mL

## Material y Métodos

### 12. ENSAYOS CON PLANTAS.-

Se realizaron en colaboración con la Doctora Camacho en el Centro “Las Torres-Tomejil” del Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (I.F.A.P.A).

#### 12.1. SOLUCIÓN NUTRITIVA PARA PLANTAS.-

Para el cultivo de las plantas se empleó la solución nutritiva de Rigaud & Puppo (1975), carente de nitrógeno combinado. Su composición se detalla a continuación:

##### SOLUCIÓN DE RIGAUD & PUPPO

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g/L
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,20 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,20 g/L
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,10 g/L
EDDHA de hierro (Sandofer <sup>a</sup> )	0,02 g/L
Solución de Gibson <sup>b</sup>	1 ml/L

El pH se ajustó entre 6,8-7,0 con KOH y se esterilizó en autoclave.

- Titular de la inscripción y distribuidor: SANDOZ AGRO, S. A. E.
- La solución de oligoelementos de Gibson consta de:

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g/L
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	2,08 g/L
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,22 g/L
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,08 g/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,13 g

#### 12.2. DESINFECCIÓN Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS.-

Las semillas se desinfectaron tratándolas en primer lugar con etanol de 96° durante un minuto. Tras lavarlas con agua destilada estéril, se mantuvieron en hipoclorito sódico al 10% (m/v) durante 8 minutos y, finalmente, se lavaron con abundante agua destilada estéril hasta que el pH del agua del lavado alcanzó la neutralidad. En el caso de *L. leucocephala*, las semillas fueron escarificadas previamente a la desinfección. Las semillas desinfectadas se colocaron en placas de Petri que contenían agar-agua al 1% (m/v) (10 semillas/placa), y se incubaron a 28°C en oscuridad hasta su germinación.

### 12.3. ENSAYOS DE NODULACIÓN.-

Como soporte se usó un sistema estéril denominado jarro de Leonard (Vincent, 1970) con tamaño grande para *P. vulgaris* y pequeño para *L. leucocephala*. Se usó una mezcla 3:1 de vermiculita y perlita como sustrato. En el depósito de los jarros se añadió la solución nutritiva de Rigaud & Puppo diluida a la mitad y con el pH ajustado a 7. El sistema completo se esterilizó en autoclave durante 40 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C). En cada jarro se colocaron tres semillas desinfectadas y germinadas, y cada una de ellas se inoculó con 1 mL de una suspensión que contenía del orden de  $10^8$  células/mL de la bacteria a ensayar cultivada en medio YM. En todos los ensayos se incluyó la estirpe *R. tropici* CIAT899 como referencia y un control no inoculado. Se realizaron cuatro repeticiones por bacteria y condición. Las plantas se mantuvieron en cámara con un fotoperiodo de 16 horas de luz (26°C,  $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y 8 horas de oscuridad (18°C), y con un 80% de humedad relativa. Cuando las plántulas comenzaron a emerger, los jarros se cubrieron con una capa de 1 cm de espesor de grava seca y estéril. Tras una semana de crecimiento, se realizó un aclareo y se dejaron 2 plantas por jarro. La solución nutritiva de los jarros de Leonard se fue reponiendo periódicamente a medida que iba siendo agotada por las plantas. Pasado un mes y medio en el caso de la judía y dos meses en el caso de la leucena, las plantas se recolectaron con el fin de determinar la masa seca de su parte aérea, y el número y masa seca de los nódulos.

#### 12.3.1. MASA SECA DE LA PARTE AÉREA DE LAS PLANTAS.-

La parte aérea de las plantas se separó de las raíces y se secó en una estufa de desecación (J.P.Selecta) con circulación de aire forzado a 80°C durante 48 horas. El material se mantuvo 24 horas más con la estufa apagada hasta que alcanzó de nuevo la temperatura ambiente y, en estas condiciones, se pesó.

#### 12.3.2. NÚMERO DE NÓDULOS.-

Una vez lavadas las raíces de las plantas noduladas, los nódulos se separaron manualmente y se contaron.

#### 12.3.3. MASA SECA DE LOS NÓDULOS.-

Los nódulos de cada planta se secaron en estufa de desecación en las mismas condiciones que la parte aérea de las plantas y, posteriormente, se pesaron.

## **Material y Métodos**

### **12.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.-**

El estudio estadístico se realizó con el programa Statistix for Windows Analytical Software, usando el análisis de la varianza (ANOVA). Para la comparación múltiple de las medias se usó el test LSD (mínima diferencia significativa) de Fisher protegido, con un nivel de significación del 5%.

### **12.4. ENSAYOS DE COMPETITIVIDAD EN NODULACIÓN.-**

Los ensayos para determinar la competitividad por la nodulación entre las estirpes de rizobios, se realizaron en jarros de Leonard con plantas de judía. Las bacterias se cultivaron en medio YM hasta fase estacionaria (D.O. a 600 nm de 0,6 a 0,8). Entonces se prepararon mezclas que contenían las dos estirpes objeto de estudio en la misma proporción (1:1). Cada semilla se inoculó con 1 mL de esta mezcla. Tras 30 días de cultivo, los nódulos se separaron manualmente de las raíces de las plantas y se analizaron 100 de cada combinación para identificar las bacterias que los ocupaban.

#### **12.4.1. AISLAMIENTO DE LAS BACTERIAS DE LOS NÓDULOS.-**

Para identificar las estirpes que los ocupaban, los nódulos recién recolectados se desinfectaron con hipoclorito sódico al 5% (m/v) durante 5 minutos. Después se lavaron con abundante agua destilada estéril y se rodaron en una placa de medio sólido TY para comprobar la ausencia de bacterias en su superficie. Los nódulos se aplastaron por separado con una pinza estéril, y su contenido se sembró por zonas en placas de medio TY con actidiona (100 µg/mL) que se incubaron a 28°C. Cuando crecieron, las colonias se picaron en nuevas placas de medio TY suplementadas con los antibióticos adecuados para distinguir entre la estirpe silvestre *R. tropici* CIAT899 (Rif<sup>R</sup>) y la mutante (Rif<sup>R</sup> Km<sup>R</sup>), y se determinó el porcentaje de ocupación de los nódulos de cada estirpe.

### **12.5. ENSAYOS DE COLONIZACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LA RAÍZ.-**

Las bacterias a ensayar fueron marcadas con los plásmidos pMUS4641 y pMUS4655, portadores de los genes que codifican las proteínas fluorescentes azul (BFP) y verde (GFP) respectivamente. Se cultivaron en medio YM con los antibióticos adecuados hasta fase estacionaria. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con agua destilada estéril y se resuspendieron en **tampón fosfato** (pH 7,0). Se prepararon mezclas que contenían las dos estirpes objeto de estudio, marcadas con plásmidos diferentes, en la misma proporción (1:1).

Los ensayos se realizaron con plantas de judía y se usaron pequeñas macetas que contenían arena estéril como sustrato. En cada maceta se colocaron dos semillas desinfectadas y germinadas, y se inocularon con 10 mL de tampón fosfato que contenía la mezcla de bacterias en proporción 1:1. Las plantas se mantuvieron durante una semana en cámara con un fotoperiodo de 16 horas de luz (26°C, 400  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y 8 horas de oscuridad (18°C), y con un 80% de humedad relativa, y se regaron cada tres días con la solución nutritiva de Rigaud & Puppo diluída a la mitad. Pasado ese tiempo las raíces se lavaron en tampón fosfato pH 7,0 para eliminar el exceso de arena, y las bacterias adheridas a la superficie de distintos pelos radicales se observaron y fotografiaron mediante microscopía confocal (Leica TCS SP2) en el Servicio de Microscopía del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS).

### **TAMPÓN FOSFATO**

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  25 mM

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  25 mM

Se ajustó el pH a 7,0.



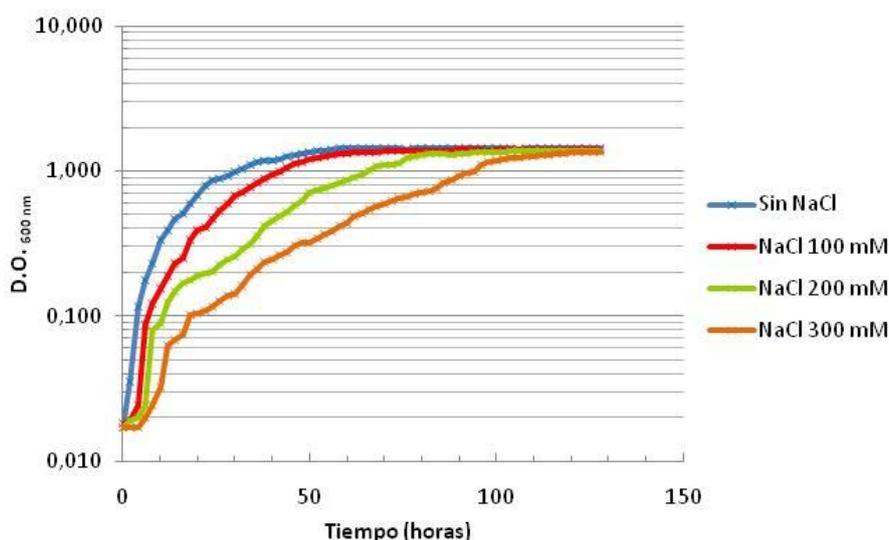
## *Resultados*

---



## 1. ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE *R. tropici* CIAT899 BAJO ESTRÉS SALINO.-

Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo establecieron que la concentración de NaCl más alta tolerada por *R. tropici* CIAT899 es 300 mM (Estévez, J. Tesis Doctoral, 2007). Para determinar los efectos que el estrés salino produce sobre el crecimiento de CIAT899 y conocer si parte de la población muere en estas condiciones o si la bacteria experimenta un lento proceso de adaptación al estrés, se realizaron curvas de crecimiento en medio TY líquido con diferentes concentraciones de NaCl (100, 200 y 300 mM), tomando como control el crecimiento en medio TY sin NaCl. Las curvas de crecimiento obtenidas y los datos derivados de su análisis se muestran en la **Figura R1** y en la **Tabla R1**, respectivamente.



**Figura R1.-** Curvas de crecimiento de *R. tropici* CIAT899 en medio TY y en medio TY con NaCl 100, 200 y 300 mM. Los valores de D.O. a 600 nm corresponden a la media de tres repeticiones independientes. El valor de la desviación estándar en cada punto no fue superior a 0,06 unidades.

En la **Figura R1** se puede observar un retraso en el crecimiento de CIAT899 a medida que aumenta la concentración de NaCl en el medio. Como refleja la **Tabla R1**, cuando CIAT899 creció en medio TY su tiempo de generación fue de 5 horas. Al aumentar la concentración de NaCl en el medio, el tiempo de generación aumentó pasando a ser de 8, 11 y 20 horas con NaCl 100, 200 y 300 mM, respectivamente. De igual manera, se observó un ligero incremento en el tiempo de latencia de la bacteria, que pasó a ser de 4, 6 y 8 horas con NaCl 100, 200 y 300 mM, respectivamente. Sin

## Resultados

embargo, las curvas de crecimiento y los recuentos del número de células mostraron que, en las cuatro condiciones, se alcanzó un número de células viables similar en la fase estacionaria.

**Tabla R1.-** Evolución del número de células viables, tiempo de generación y duración de la fase de latencia de *R. tropici* CIAT899 en medio TY y en medio TY con NaCl 100, 200 y 300 mM.

Concentración de NaCl	Nº inicial de U.F.C./mL	Nº final de U.F.C./mL	Tiempo de generación (horas)	Tiempo de latencia (horas)
-	$2,6 \times 10^7$	$8,6 \times 10^9$	5	0
100 mM	$2,4 \times 10^7$	$6,3 \times 10^9$	8	4
200 mM	$2,1 \times 10^7$	$5,9 \times 10^9$	11	6
300 mM	$2,5 \times 10^7$	$4,2 \times 10^9$	20	8

Se estudió la evolución del número de células viables de los cultivos crecidos sin NaCl y con NaCl 300 mM durante las primeras horas tras la inoculación del medio. Se observó que en medio TY (control) el número de células viables de CIAT899 aumentó en un orden de magnitud exponencial durante las primeras 6 horas de cultivo, mientras que con NaCl 300 mM el número de células viables se mantuvo estable durante ese tiempo (**Tabla R2**). Esto nos indica que con una concentración de NaCl de 300 mM no hay muerte celular en la población bacteriana y que CIAT899 experimenta una larga fase de latencia para adaptarse al estrés salino. Tras 18 horas de cultivo se observó un aumento en el número de células viables en los cultivos sometidos a estrés, lo que se podría corresponder con el comienzo de la fase de crecimiento exponencial.

**Tabla R2.-** Medidas de la D.O. a 600 nm y recuentos del número de células viables de *R. tropici* CIAT899 durante las primeras horas de crecimiento en medio TY y en medio TY con NaCl 300 mM.

	3 horas		6 horas		18 horas	
	D.O. 600 nm	U.F.C./mL	D.O. 600 nm	U.F.C./mL	D.O. 600 nm	U.F.C./mL
TY	0,055	$5,6 \times 10^7$	0,175	$2,3 \times 10^8$	0,398	$1,9 \times 10^9$
TY + NaCl 300mM	0,042	$4,7 \times 10^7$	0,058	$5,7 \times 10^7$	0,102	$1,2 \times 10^8$

## 2. OBTENCIÓN DE MUTANTES AFECTADOS EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *nod* BAJO ESTRÉS SALINO.-

Como se mencionó en la **Introducción**, tanto la apigenina como el estrés salino (NaCl 300 mM) inducen la expresión de los genes *nod* y, en consecuencia, la

producción de factores Nod en *R. tropici* CIAT899 (Estévez, J. Tesis Doctoral, 2007). Para abordar el estudio de la regulación de la expresión de los genes *nod* en condiciones de estrés salino sin flavonoides, se obtuvieron mutantes afectados en la producción de los factores Nod bajo estrés salino que no tuvieran afectada su producción con apigenina.

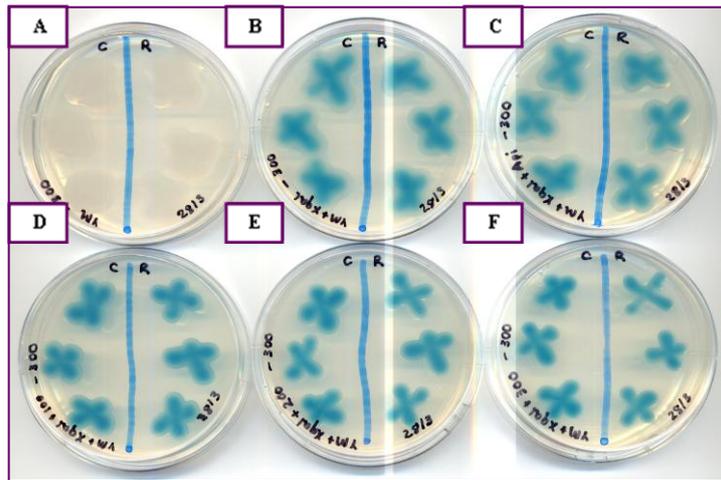
### 2.1. MUTAGÉNESIS AL AZAR CON Tn5-Mob.-

Se realizó una mutagénesis al azar transfiriendo mediante conjugación el plásmido movilizable pSUP5011, portador del transposón Tn5-Mob (Reinhard Simon, 1984), desde la estirpe donadora S17.1 de *E. coli* a las estirpes RSP3051 y CIAT899[pMP240] de *R. tropici*. La estirpe RSP3051 deriva de CIAT899 por inserción del cassette *lacZ*-Gm en el gen *nodP* del plásmido simbiótico. Este gen está implicado en la síntesis del grupo sulfato de los factores Nod de esta bacteria. La estirpe CIAT899[pMP240] lleva en el plásmido pMP240 una fusión del promotor del gen *nodA* (*pnodA*) de *R. leguminosarum* bv. *viciae* con el gen informador *lacZ* de *E. coli* sin promotor. Debido a estas fusiones transcripcionales, ambas estirpes presentan una elevada actividad  $\beta$ -galactosidasa cuando expresan los genes *nod* por inducción con apigenina o con estrés salino. Su empleo como fondo genético permitirá discriminar aquellos transconjugantes que, debido a la inserción del transposón, tengan alterada la expresión de los genes *nod* con estrés salino pero mantengan su expresión en condiciones de inducción por apigenina.

### 2.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA REALIZAR LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA.-

Para la obtención de los mutantes, se realizaron ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en medio YM tanto sólido como líquido, comparando el nivel de actividad de las bacterias en ausencia de inductores, con apigenina (1  $\mu$ g/mL) y con diferentes concentraciones de NaCl (100, 200 y 300 mM). En la **Figura R2** se puede observar que en medio sólido RSP3051 mostró una elevada actividad  $\beta$ -galactosidasa en ausencia de inductores (**panel B**), apenas distinguible de la tonalidad azul que presentaron sus células en condiciones de inducción, tanto con apigenina (**panel C**) como con las diferentes concentraciones de NaCl (**paneles D, E y F**). Por este motivo se descartó el medio sólido como soporte para la obtención de los mutantes derivados de RSP3051.

## Resultados



**Figura R2.-** Actividad  $\beta$ -galactosidasa de *R. tropici* CIAT899 (mitad izquierda de las placas, C) y *R. tropici* RSP3051 (mitad derecha de las placas, R) procedentes de un precultivo crecido en medio YM con NaCl 300 mM. **Panel A.-** medio YMA. **Panel B.-** medio YMA + X-gal. **Panel C.-** medio YMA + X-gal + apigenina (1  $\mu$ g/mL). **Panel D.-** medio YMA + X-gal + NaCl 100 mM. **Panel E.-** medio YMA + X-gal + NaCl 200 mM. **Panel F.-** medio YMA + X-gal + NaCl 300 mM. La fotografía se tomó a los 5 días de sembrar las placas.

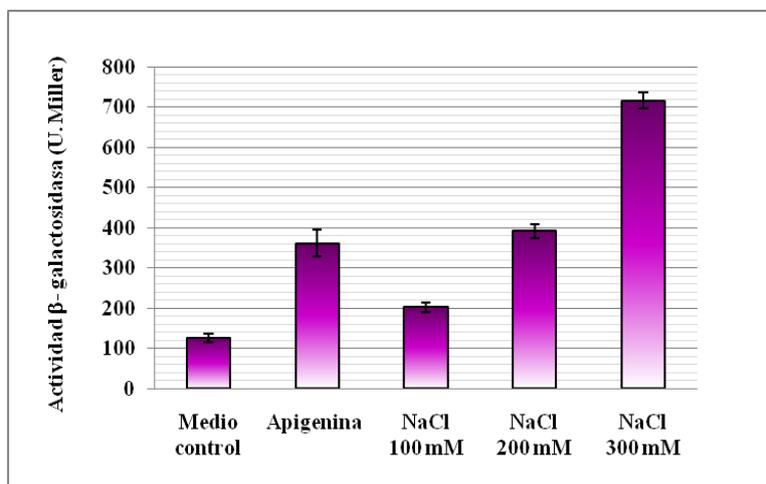
En la **Figura R3** se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa realizados con RSP3051 en medio líquido. Se observó una elevada actividad en medio YM sin inductores, y un notable incremento con las distintas concentraciones de NaCl. Con NaCl de 200 mM el nivel de expresión de los genes *nod* se igualó al conseguido con apigenina, y con NaCl 300 mM llegó a superarse, casi duplicarse, dicho nivel. Por ello, se escogieron el medio líquido y la concentración de NaCl de 300 mM para la obtención de los mutantes derivados de RSP3051.

Sin embargo, al poseer CIAT899[pMP240] el plásmido pMP240 en multicopia, el incremento de la actividad  $\beta$ -galactosidasa que mostró la estirpe en condiciones de inducción se detectó fácilmente en medio sólido (**Figura R4**). Al emplear esta estirpe como receptora del transposón, los transconjugantes con escasa actividad  $\beta$ -galactosidasa bajo estrés salino se pudieron diferenciar eficazmente en medio sólido.

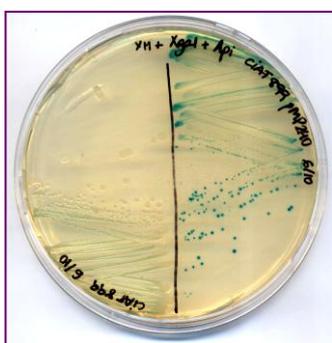
### 2.3. MUTANTES DERIVADOS DE *R. tropici* RSP3051.-

Los transconjugantes se seleccionaron en medio sólido TY con rifampicina (50  $\mu$ g/mL), kanamicina (60  $\mu$ g/mL) y NaCl 200 mM, dado que con esta concentración de NaCl se obtuvo un mejor crecimiento de las colonias que con 300 mM. Se tomaron 2500 colonias, que se cultivaron en medio YM, medio YM con apigenina (1  $\mu$ g/mL) y medio YM con NaCl 300 mM en placas de microtítulo, donde se les realizó el ensayo

de actividad  $\beta$ -galactosidasa por triplicado. Los datos obtenidos se analizaron con el programa informático Excel y se escogieron aquellos clones que bajo estrés salino mostraron menor actividad  $\beta$ -galactosidasa que en condiciones de inducción por apigenina.



**Figura R3.-** Actividad  $\beta$ -galactosidasa de *R. tropici* RSP3051 en medio YM en condiciones control, con apigenina (1  $\mu$ g/mL), y con NaCl 100, 200 y 300 mM. Los ensayos se realizaron por triplicado. Las barras verticales indican las desviaciones estándar.

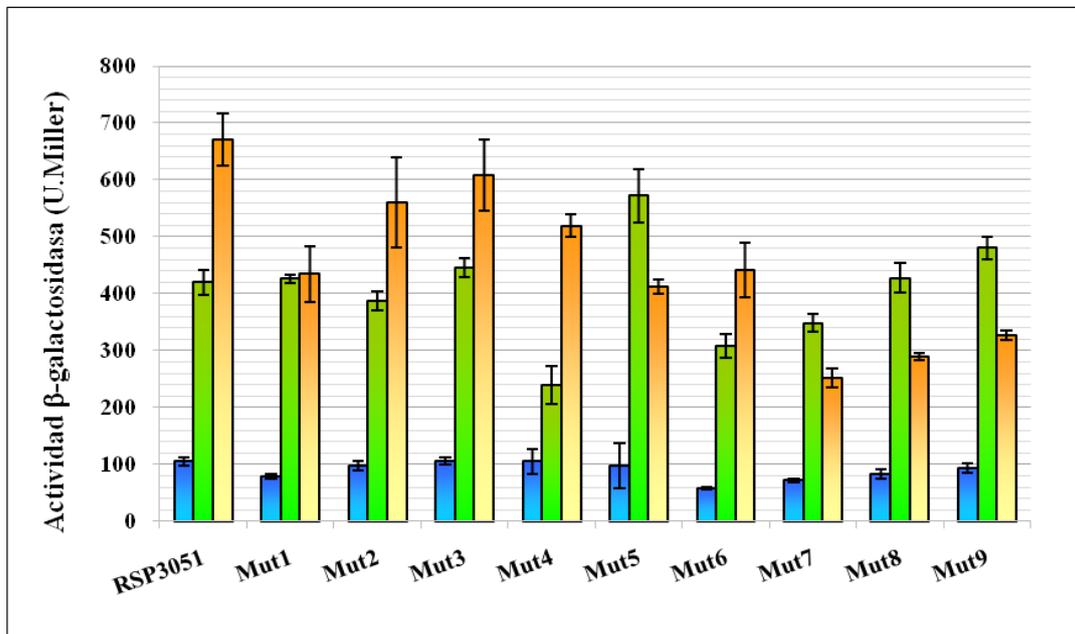


**Figura R4.-** Actividad  $\beta$ -galactosidasa de *R. tropici* CIAT899 (mitad izquierda de la placa) y de *R. tropici* CIAT899[pMP240] (mitad derecha de la placa) en medio YMA con X-gal (32  $\mu$ g/mL) y apigenina (1  $\mu$ g/mL).

De esta forma se obtuvieron 9 clones que se nombraron con las siglas “Mut” seguidas de un número de orden, y se purificaron tres veces sucesivas en el mismo medio de selección de los transconjugantes. Posteriormente, se confirmó su comportamiento realizando, por triplicado, un nuevo ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa en medio líquido. Los resultados se muestran en la **Figura R5**. Como se observa, RSP3051 mostró un aumento en el nivel de actividad de cuatro veces cuando creció con apigenina y, de siete veces cuando creció con NaCl 300 mM respecto al valor obtenido sin inductores. Los clones **Mut1**, **Mut2**, **Mut3**, **Mut4** y **Mut6** carecieron de

## Resultados

interés ya que se comportaron como su estirpe parental. Los clones **Mut5**, **Mut7**, **Mut8** y **Mut9** mostraron un descenso de actividad con NaCl 300 mM respecto a la mostrada con apigenina. De ellos, el clon **Mut8** fue especialmente interesante ya que, con apigenina se comportó como RSP3051, pero con NaCl 300 mM su nivel de actividad se redujo a la mitad.

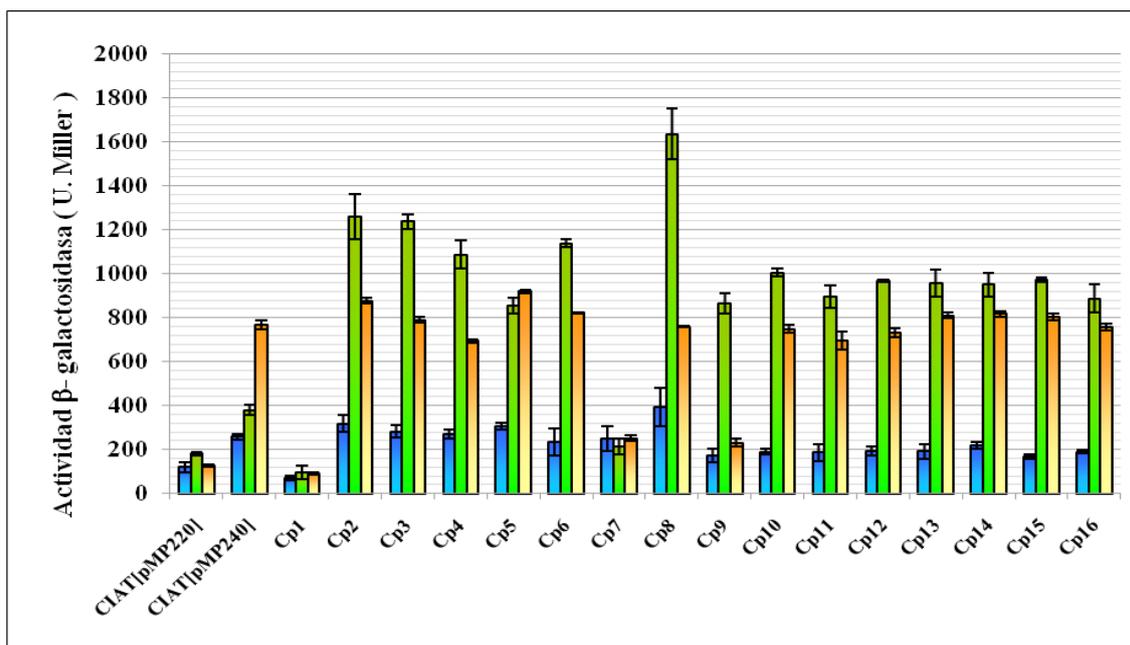


**Figura R5.-** Actividad  $\beta$ -galactosidasa de *R. tropici* RSP3051 y de 9 clones derivados de ella por inserción de Tn5-Mob. Las medidas fueron realizadas por triplicado. Las barras verticales indican las desviaciones estándar. **Color azul.-** medio YM (control), **color verde.-** medio YM + Apigenina (1  $\mu$ g/mL) y **color naranja.-** medio YM + NaCl 300 mM.

### 2.4. MUTANTES DERIVADOS DE *R. tropici* CIAT899[pMP240].-

Los transconjugantes se seleccionaron en medio sólido TY con rifampicina (50  $\mu$ g/mL), kanamicina (60  $\mu$ g/mL) y tetraciclina (10  $\mu$ g/mL). Se tomaron 6000 colonias y se les realizó un ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa en paralelo en medio YMA con apigenina (1  $\mu$ g/mL) y X-gal, y en medio YMA con NaCl 200 mM y X-gal. Se escogieron aquellos clones que presentaron color azul en las placas con apigenina y color blanco en las placas con NaCl 200 mM. De esta forma se obtuvieron 16 clones que se nombraron con las siglas “Cp” (de CIAT899[pMP240]) seguidas de un número de orden, y se purificaron tres veces sucesivas en el mismo medio de selección de los transconjugantes. A continuación se cuantificó el nivel de expresión del gen *nodA* del pMP240 en todos ellos, realizando por triplicado el ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa en tubos de medio líquido. Como control positivo se empleó CIAT899[pMP240] y

como control negativo CIAT899[pMP220], en la que el plásmido pMP220 porta el gen *lacZ* sin promotor. Los resultados se muestran en la **Figura R6**. Al igual que CIAT899[pMP240], la mayoría de los clones presentaron valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa inferiores con NaCl 300 mM que con apigenina. No obstante, los clones **Cp1** y **Cp7** mostraron niveles basales de actividad en todas las condiciones. Los clones **Cp8** y **Cp9** fueron los más interesantes, ya que presentaron un notable descenso de actividad con estrés salino frente al valor que mostraron con apigenina.



**Figura R6.-** Actividad  $\beta$ -galactosidasa de *R. tropici* CIAT899[pMP240] y de 16 clones derivados de ella por inserción de Tn5-Mob. Las medidas fueron realizadas por triplicado. Las barras verticales indican las desviaciones estándar. **Color azul.-** medio YM (control), **color verde.-** medio YM + Apigenina (1  $\mu$ g/mL) y **color naranja.-** medio YM + NaCl 300 mM.

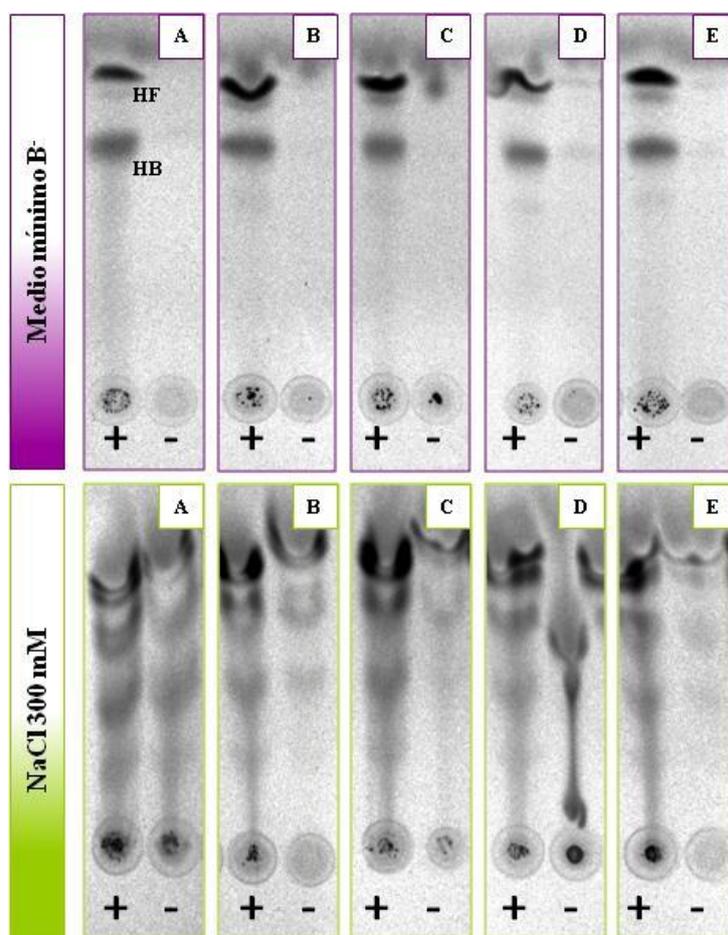
### 3. SELECCIÓN DE LOS MUTANTES AFECTADOS EN LA PRODUCCIÓN DE FACTORES NOD BAJO ESTRÉS SALINO.-

Los clones escogidos para los análisis fueron los derivados de *R. tropici* RSP3051 **Mut5**, **Mut7**, **Mut8** y **Mu9**, y los derivados de *R. tropici* CIAT899[pMP240] **Cp1**, **Cp7**, **Cp8** y **Cp9**. Las estirpes se cultivaron en medio B<sup>-</sup> y medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM, en presencia y en ausencia de apigenina. El perfil de los factores Nod de los cuatro clones derivados de RSP3051 se muestra en la **Figura R7**, y el de los cuatro clones derivados de CIAT899[pMP240] en la **Figura R8**.

Como se observa en los **paneles A superiores** de las **Figuras R7** y **R8**, los factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899 en medio B<sup>-</sup> con apigenina se agrupan

en dos conjuntos cromatográficamente distintos. El primer grupo comprende factores Nod de naturaleza hidrofílica (HF) que se corresponden con la banda más elevada en la placa cromatográfica (Folch-Mallol *et al.*, 1996). Por sus abundantes radicales hidrofílicos (grupos sulfato entre otros) estos factores Nod se desplazan fácilmente junto con el frente del solvente utilizado. El segundo grupo de factores Nod engloba aquellos más hidrofóbicos (HB) que, por su menor coeficiente de migración, se sitúan desde la parte media de la placa hacia la zona de aplicación de la muestra. La mayoría de los mutantes analizados produjeron factores Nod en medio B<sup>-</sup> con apigenina y mostraron el mismo perfil de bandas que CIAT899 en ausencia de estrés (**Figuras R7 y R8, paneles superiores**), con la excepción del mutante Cp7, que no produjo factores Nod en estas condiciones (**Figura R8, panel C superior**).

Cuando se realizó el análisis en medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM, se comprobó que CIAT899 producía factores Nod tanto en presencia como en ausencia de apigenina (**Figuras R7 y R8, paneles A inferiores**), y que el número de bandas era superior y estas eran más intensas que las observadas en medio B<sup>-</sup> con apigenina y sin NaCl (**Figuras R7 y R8, carril negativo de los paneles A superiores**). Como se observa en la **Figura R7**, los mutantes **Mut5**, **Mut7**, **Mut8** y **Mu9** produjeron factores Nod en condiciones de estrés salino con y sin apigenina (**Figura R7, paneles inferiores**). Es decir, aunque mostraban bandas menos intensas que CIAT899, estos mutantes no perdieron la capacidad de producir factores Nod en medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM sin apigenina. Como se observa en la **Figura R8**, en medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM, el mutante **Cp1** mostró el mismo comportamiento que CIAT899 con y sin apigenina (**panel B inferior**). El mutante **Cp7** no produjo factores Nod en ninguna de estas dos condiciones (**panel C inferior**), comportándose igual que en medio B<sup>-</sup>. Los mutantes **Cp8** y **Cp9** produjeron factores Nod sólo con apigenina (**paneles D y E inferiores**, respectivamente), y perdieron parcial (Cp8) y totalmente (Cp9) la capacidad de producir factores Nod en condiciones de estrés salino sin apigenina (**carril negativo de los paneles D y E inferiores**). Por todo ello, los mutantes **Cp7**, **Cp8** y **Cp9** fueron seleccionados para su posterior estudio y caracterización.

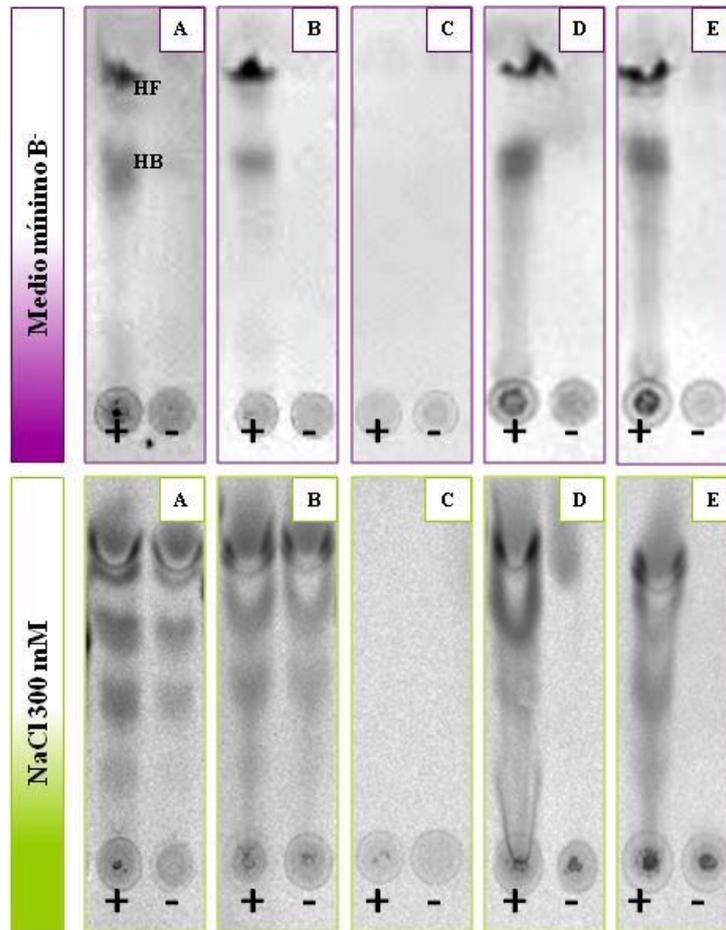


**Figura R7.-** Análisis mediante cromatografía en capa fina de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 y cuatro estirpes derivadas de *R. tropici* RSP3051 por inserción de Tn5-Mob, en medio B<sup>-</sup> (panel superior) y en medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM (panel inferior). **Paneles A.-** CIAT899, **paneles B.-** Mut5, **paneles C.-** Mut7, **paneles D.-** Mut8 y **paneles E.-** Mut9. Los carriles con signo positivo corresponden a los cultivos inducidos con 1 µg/mL de apigenina. HB: hidrofóbico; HF: hidrofílico.

### 3.1. CURACIÓN DEL PLÁSMIDO pMP240 EN LOS MUTANTES Cp7, Cp8 Y Cp9. ESTUDIO DE SU PERFIL DE PLÁSMIDOS. CONFIRMACIÓN DE LA ESPECIE.-

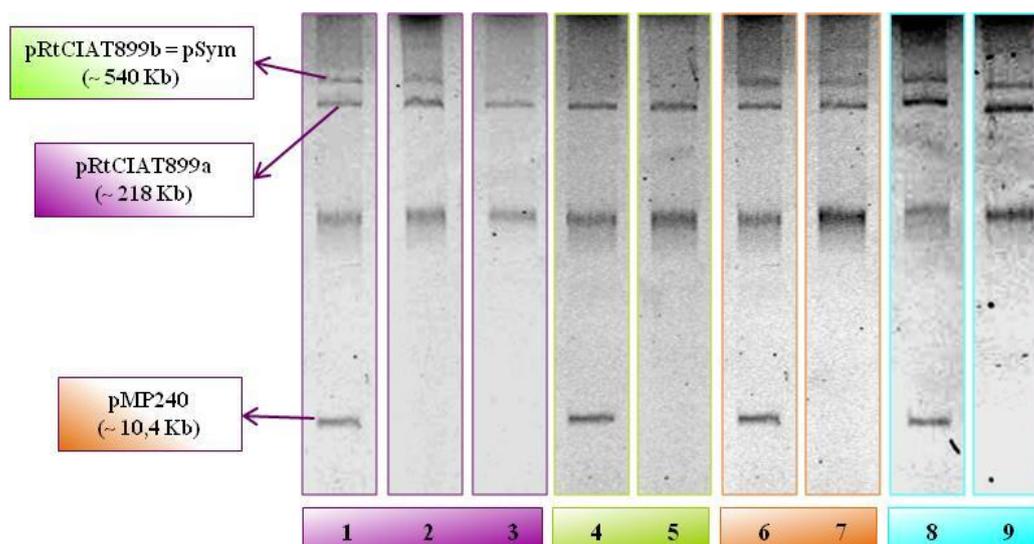
Una vez confirmado que los mutantes **Cp7**, **Cp8** y **Cp9** no producían factores Nod bajo estrés salino sin apigenina, se procedió a eliminarles el plásmido pMP240 utilizado para su selección. La curación de pMP240 se realizó seleccionando la pérdida de la resistencia a la tetraciclina codificada por dicho plásmido. Para ello, los mutantes se cultivaron hasta fase estacionaria siete veces sucesivas en medio TY líquido con rifampicina (50 µg/mL) y sin tetraciclina. Finalmente, se sembraron en placas de medio TY con rifampicina. De las colonias que crecieron, se seleccionaron las sensibles a tetraciclina y, posteriormente, se analizó su perfil de plásmidos para comprobar la ausencia de pMP240.

## Resultados



**Figura R8.-** Análisis mediante cromatografía en capa fina de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 y cuatro estirpes derivadas de *R. tropici* CIAT899[pMP240] por inserción de Tn5-Mob, en medio B<sup>-</sup> (panel superior) y en medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM (panel inferior). **Paneles A.-** CIAT899, **paneles B.-** Cp1, **paneles C.-** Cp7, **paneles D.-** Cp8 y **paneles E.-** Cp9. Los carriles con signo positivo corresponden a los cultivos inducidos con 1 µg/mL de apigenina. HB: hidrofóbico; HF: hidrofílico.

Como se puede observar en la **Figura R9**, en el perfil de plásmidos de *R. tropici* CIAT899 (**carril 2**) se detectan dos bandas en la zona superior correspondientes a los plásmidos pRtCIAT899a y pRtCIAT899b (pSym). Además, en el perfil de CIAT899[pMP240] se detecta una banda de mayor movilidad que corresponde al plásmido pMP240 (**carril 1**). El perfil de RSP900 carece de pRtCIAT899b (**carril 3**). Por otra parte, como se observa en los **carriles 5, 7 y 9**, se obtuvieron clones derivados de los mutantes **Cp7, Cp8 y Cp9** que carecían de pMP240 pero conservaban el resto de plásmidos presentes en el mutante del que derivan (**carriles 4, 6 y 8**, respectivamente). Estos nuevos clones se denominaron **C7, C8 y C9**, respectivamente. Sin embargo, el mutante **Cp7** y su derivado **C7** perdieron el plásmido simbiótico pRtCIAT899b (**carriles 4 y 5**).

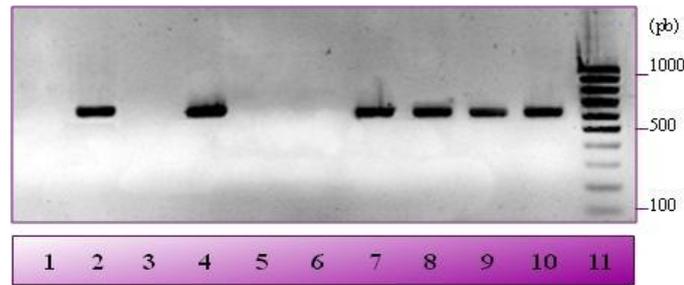


**Figura R9.-** Perfil de plásmidos de *R. tropici* CIAT899 y varias estirpes derivadas. **Carril 1.-** CIAT899[pMP240], **carril 2.-** CIAT899, **carril 3.-** RSP900, **carril 4.-** Cp7, **carril 5.-** C7 (derivado de Cp7 curado de pMP240), **carril 6.-** Cp8, **carril 7.-** C8 (derivado de Cp8 curado de pMP240), **carril 8.-** Cp9 y **carril 9.-** C9 (derivado de Cp9 curado de pMP240). A la izquierda de la figura se indica el nombre y tamaño de los plásmidos observados.

Para confirmar estos resultados, se analizó la presencia del pSym en las estirpes mencionadas amplificando mediante PCR un fragmento de ~ 630 pb del gen *nodD1* presente en el pSym de *R. tropici* CIAT899 empleando los cebadores CIATnodD-F y CIATnodD-R. Como se aprecia en la **Figura R10**, en CIAT899 (**carril 2**), CIAT899[pMP240] (**carril 4**), los mutantes **Cp8** y **Cp9** (**carriles 7 y 9**) y sus derivados **C8** y **C9** (**carriles 8 y 10**), la banda amplificada tuvo un tamaño de ~ 630 pb, lo que confirmó la presencia de *nodD1* en todas ellas. Sin embargo, no se apreció ninguna banda en los carriles correspondientes a RSP900 (**carril 3**), al mutante **Cp7** (**carril 5**) ni a su derivado **C7** (**carril 6**). Estos resultados ponen de manifiesto la pérdida del pSym en el mutante **Cp7**, lo que explica su incapacidad de producir factores Nod (**paneles C** de la **Figura R8**).

Por otra parte, se amplificó, aisló y secuenció el ADN que codifica el ARNr 16S en los mutantes **C7**, **C8** y **C9**, empleando los cebadores universales 16S-F y 16S-R y tomando como molde ADN genómico de los mutantes. El análisis de las secuencias obtenidas reveló un 99% de identidad con la secuencia del gen que codifica el ARNr 16S en *R. tropici* CIAT899 (número de acceso en GenBank EU488752). Estos resultados confirmaron que los mutantes **C7**, **C8** y **C9** pertenecen a la especie *R. tropici*.

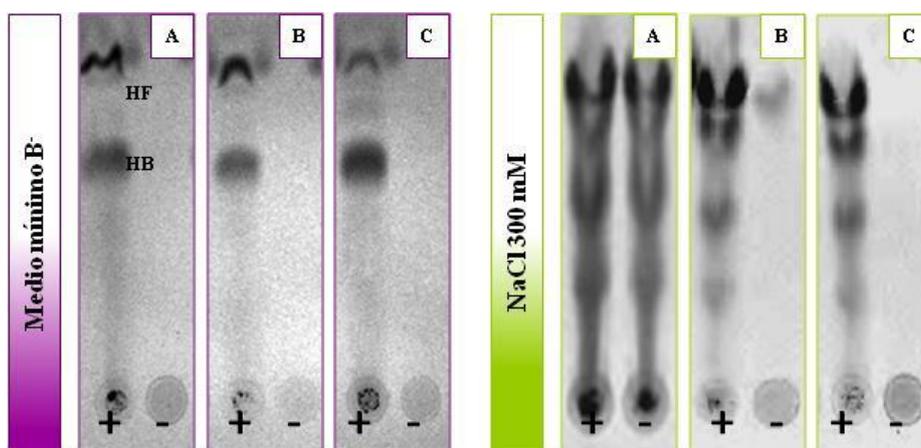
## Resultados



**Figura R10.-** Amplificación por PCR de un fragmento del gen *nodD1* con los cebadores CIATnodD-F y CIATnodD-R y empleando como molde ADN genómico de *R. tropici* CIAT899 y de varias estirpes derivadas de ella. **Carril 1.-** control sin ADN, **carril 2.-** CIAT899, **carril 3.-** RSP900, **carril 4.-** CIAT899[pMP240], **carril 5.-** Cp7, **carril 6.-** C7, **carril 7.-** Cp8, **carril 8.-** C8, **carril 9.-** Cp9, **carril 10.-** C9 y **carril 11.-** marcador de 100 pb. Los tamaños del marcador (pb) se muestran a la derecha de la figura.

### 3.2. PERFIL DE PRODUCCIÓN DE FACTORES NOD DE LOS MUTANTES C8 Y C9.-

Para asegurar que durante el proceso de curación del plásmido pMP240 no se habían perdido otras propiedades y que realmente se trataba de clones derivados de los mutantes Cp8 y Cp9, se realizaron nuevas cromatografías en capa fina para analizar la producción de los factores Nod de **C8** y **C9**. Como se observa en la **Figura R11**, los mutantes **C8** y **C9** presentaron el mismo perfil de producción que Cp8 y Cp9, respectivamente. Ambos se comportaron como CIAT899 en todas las condiciones excepto con estrés salino sin apigenina (**carriles negativos**), donde la producción de factores Nod se redujo de forma considerable en el mutante **C8** (**panel B**), y el mutante **C9** no produjo factores Nod (**panel C**). Estos resultados nos permitieron continuar los estudios de caracterización con **C8** y **C9**.



**Figura R11.-** Análisis mediante cromatografía en capa fina de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 y los mutantes C8 y C9 en medio B<sup>-</sup> (panel izquierdo) y en medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM (panel derecho). **Paneles A.-** CIAT899, **paneles B.-** C8, y **paneles C.-** C9. Los carriles con signo positivo corresponden a los cultivos inducidos con 1 µg/mL de apigenina. HB: hidrofóbico; HF: hidrofílico.

#### 4. ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE C8.-

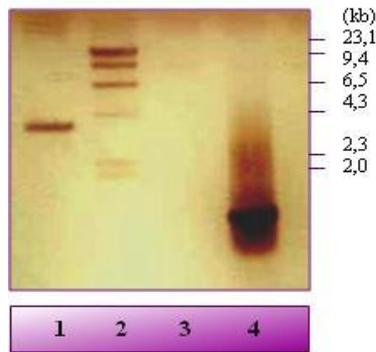
Una vez comprobado que, en ausencia del plásmido pMP240, el mutante C8 presentó una menor producción de factores Nod en medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM, se procedió a identificar la región en la que se había insertado el transposón Tn5-Mob y a caracterizar otros rasgos fenotípicos del mutante.

##### 4.1. LOCALIZACIÓN DE LA INSERCIÓN EN EL MUTANTE C8.-

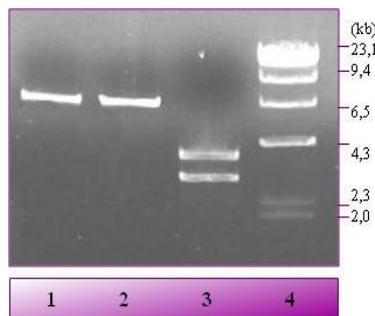
###### 4.1.1. IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DEL GEN EN EL QUE SE HA INSERTADO EL TRANSPOSÓN Tn5-Mob EN EL MUTANTE C8.-

En primer lugar se verificó la existencia de una única inserción del transposón mediante hibridación, digiriendo el ADN genómico del mutante C8 con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *BamHI* y usando como sonda un fragmento del gen de resistencia a la kanamicina. Para la preparación de la sonda se amplificó y marcó con digoxigenina un fragmento de ~ 0,9 kb del plásmido pMUS442 usando los cebadores Kan-F y Kan-R. La sonda empleada es homóloga a un fragmento del gen de resistencia a la kanamicina contenido en el transposón. El transposón Tn5-Mob no tiene diana para la enzima *EcoRI*, pero tiene un único sitio de corte para la enzima *BamHI* que no afecta al gen de resistencia a la kanamicina del transposón. Como se puede apreciar en la **Figura R12**, sólo un fragmento de aproximadamente 4 kb de tamaño hibridó con la sonda. En base a su tamaño y a la localización del punto *BamHI* en la secuencia del transposón, se dedujo que este fragmento contenía unas 3 kb de la secuencia del transposón desde el punto *BamHI* hasta uno de sus extremos incluyendo el gen de resistencia a la kanamicina, y aproximadamente 1 kb de la secuencia del ADN genómico del mutante C8 comprendida desde el punto de inserción del Tn5-Mob hasta el punto *EcoRI* más cercano en el genoma de *R. tropici* CIAT899.

Posteriormente se procedió a secuenciar el fragmento de interés para identificar el gen en el que se había insertado el transposón. Para ello, el ADN genómico del mutante C8 digerido con *EcoRI* y *BamHI* se ligó al vector pBlueScript digerido con las mismas enzimas. El resultado de la ligación se transformó a *E. coli* DH5 $\alpha$  y se seleccionaron los transformantes en medio LB con ampicilina y kanamicina. El plásmido obtenido se denominó pMUS1034 (**Figura R13**) y el inserto se secuenció tras amplificarlo con los cebadores M13 del pBlueScript, y TN5FR y TN5F específicos del transposón (**Figura R14**).



**Figura R12.-** Comprobación mediante hibridación de la inserción del transposón Tn5-Mob en el genoma del mutante C8. El ADN genómico del mutante C8 se digirió con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*. **Carril 1.-** ADN genómico del mutante C8, **carril 2.-** marcador  $\lambda$ -*HindIII* marcado con digoxigenina, **carril 3.-** control negativo sin ADN y **carril 4.-** pMUS442 digerido con la enzima *PstI* (control positivo). Los tamaños del marcador (kb) se muestran a la derecha de la figura.

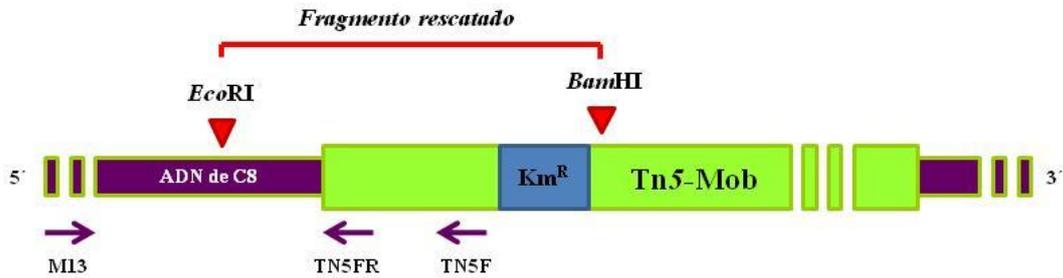


**Figura R13.-** Digestiones del plásmido pMUS1034 portador del fragmento rescatado del mutante C8. **Carril 1.-** digestión con *EcoRI*, **carril 2.-** digestión con *BamHI*, **carril 3.-** digestión con *EcoRI* + *BamHI* y **carril 4.-** marcador  $\lambda$ -*HindIII*. Los tamaños del marcador (kb) se muestran a la derecha de la figura.

Los análisis mediante la aplicación bioinformática BLAST indicaron que la secuencia de ADN rescatada del mutante C8 tiene un 100% de identidad con la secuencia del gen *glnD* de *R. tropici* CIAT899, cuyo número de acceso en GenBank es U47030 (O'Connell, 1998), y que la inserción del transposón se localiza a unas 2230 pb del extremo 5' del gen.

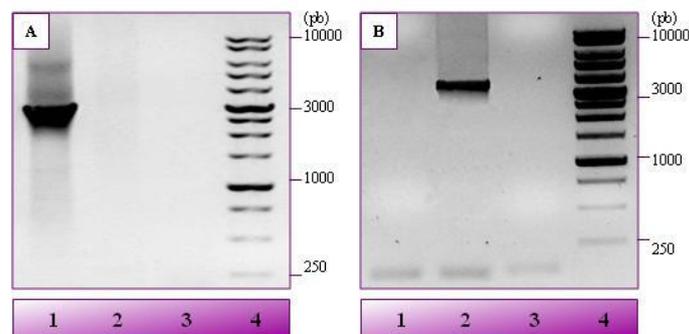
A continuación, se diseñaron los cebadores GlnD-5 y GlnD-3 y se amplificó el gen *glnD* en la estirpe silvestre y en el mutante C8. Además, mediante el uso combinado de los cebadores GlnD-5 y TN5FR se confirmó el lugar de la inserción del transposón en el mutante C8. Como se observa en el **panel A** de la **Figura R15**, la amplificación con los cebadores GlnD-5 y GlnD-3 en CIAT899 (**carril 1**) generó una banda de ~ 3 kb correspondiente al gen *glnD* intacto. En cambio, en el mutante C8 no fue posible la amplificación de *glnD* (**carril 2**) por tener el transposón (~7,5 kb) insertado. Como se puede observar en el **panel B**, la amplificación con los cebadores GlnD-5 y TN5FR

generó una banda de ~ 3,2 kb en el mutante C8 (**carril 2**) lo que de nuevo confirmó la existencia de una inserción del transposón en el gen.

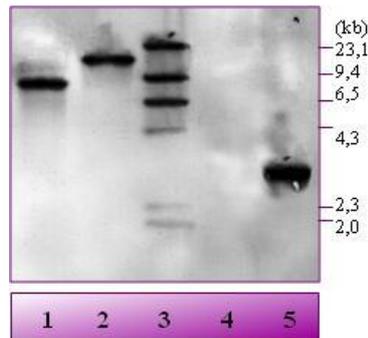


**Figura R14.-** Esquema de la región de ADN del mutante C8 en la que se insertó el transposón Tn5-Mob. Con triángulos de color rojo se indican los puntos *EcoRI* y *BamHI* empleados durante el rescate de la mutación. Con flechas se indica la posición de los cebadores usados para la amplificación y secuenciación del fragmento rescatado (M13, TN5FR y TN5F).

Posteriormente, la mutación se comprobó mediante hibridación, digiriendo el ADN genómico de CIAT899 y del mutante C8 con las enzimas *XbaI* y *ApaI*, empleando como sonda el producto de PCR de ~ 3 kb amplificado con los cebadores GlnD-5 y GlnD-3, e incorporando nucleótidos marcados con digoxigenina en la reacción. En la **Figura R16** se muestran los resultados obtenidos. La región del ADN genómico de CIAT899 en la que se localiza el gen *glnD* posee un sitio de corte para la enzima *XbaI* y otro para *ApaI* que distan ~ 8,8 kb uno de otro quedando entre ambos el gen *glnD*. El transposón Tn5-Mob no posee dianas de corte para las enzimas *XbaI* ni *ApaI*. Como se ve en la **Figura R16**, en CIAT899 un solo fragmento de ~ 8,8 kb hibridó con la sonda (**carril 1**) mientras que en el mutante C8 la banda hibridada sufrió el incremento de tamaño esperado, correspondiente al tamaño del transposón inserto en el gen (**carril 2**).



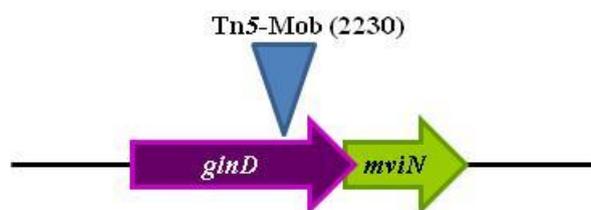
**Figura R15.-** Amplificación por PCR del gen *glnD* de *R. tropici* CIAT899 utilizando los cebadores GlnD5-GlnD3 (~ 3 kb, **Panel A**) y GlnD5-TN5FR (~ 3,3 kb, **Panel B**), y empleando como molde ADN genómico de CIAT899 y del mutante C8. **Carriles 1.-** CIAT899, **carriles 2.-** C8, **carriles 3.-** control sin ADN y **carriles 4.-** marcador de peso molecular de 1 kb. Los tamaños del marcador (pb) se muestran a la derecha de las figuras.



**Figura R16.-** Comprobación mediante hibridación de la inserción del transposón Tn5-Mob en el gen *glnD* en el mutante C8. El ADN fue digerido con las enzimas *Xba*I y *Apa*I. **Carril 1.-** ADN genómico de CIAT899, **carril 2.-** ADN genómico de C8, **carril 3.-** marcador  $\lambda$ -*Hind*III marcado con digoxigenina, **carril 4.-** control negativo sin ADN y **carril 5.-** gen *glnD* de *R. tropici* CIAT899 amplificado con los cebadores GlnD-5 y GlnD-3 (control positivo). Los tamaños del marcador (kb) se muestran a la derecha de la figura.

### 4.1.2. ORGANIZACIÓN GÉNICA DE LA REGIÓN EN LA QUE SE LOCALIZA LA INSERCIÓN.-

La inserción del transposón en el mutante C8 se localizó en el gen *glnD*, que codifica una enzima bifuncional esencial en la asimilación del nitrógeno y en la regulación de su metabolismo (O'Connell *et al.*, 1998). En *R. tropici* CIAT899 el último codón codificante y el codón STOP del gen *glnD* solapan con el codón de inicio de la transcripción del gen contiguo *mviN*, homólogo al gen de virulencia *mviN* de *Salmonella typhimurium* (**Figura R17**). Ambos genes forman un operon indispensable en el metabolismo del nitrógeno en *S. meliloti* (Rudnick *et al.*, 2001) y, muy probablemente, se cotranscriben en *R. tropici* CIAT899 (O'Connell *et al.*, 1998).



**Figura R17.-** Esquema a escala de la organización génica de la región de ADN en la que se localiza el gen *glnD* en *R. tropici* CIAT899. Las flechas indican el sentido de la transcripción. El codón de inicio del gen *mviN* (~ 1601 pb) solapa con el último codón codificante de aminoácidos y con el codón STOP del gen anterior *glnD* (~ 2915 pb). Se indica el sitio en el que se insertó el transposón Tn5-Mob en el mutante C8 (base 2230 del gen *glnD*).

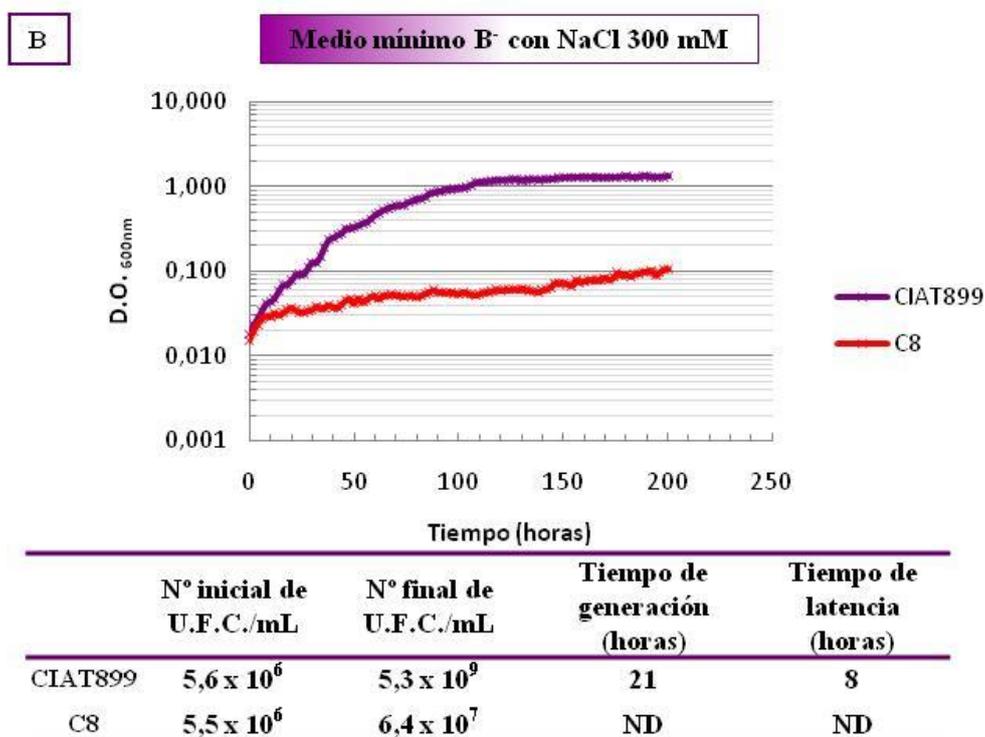
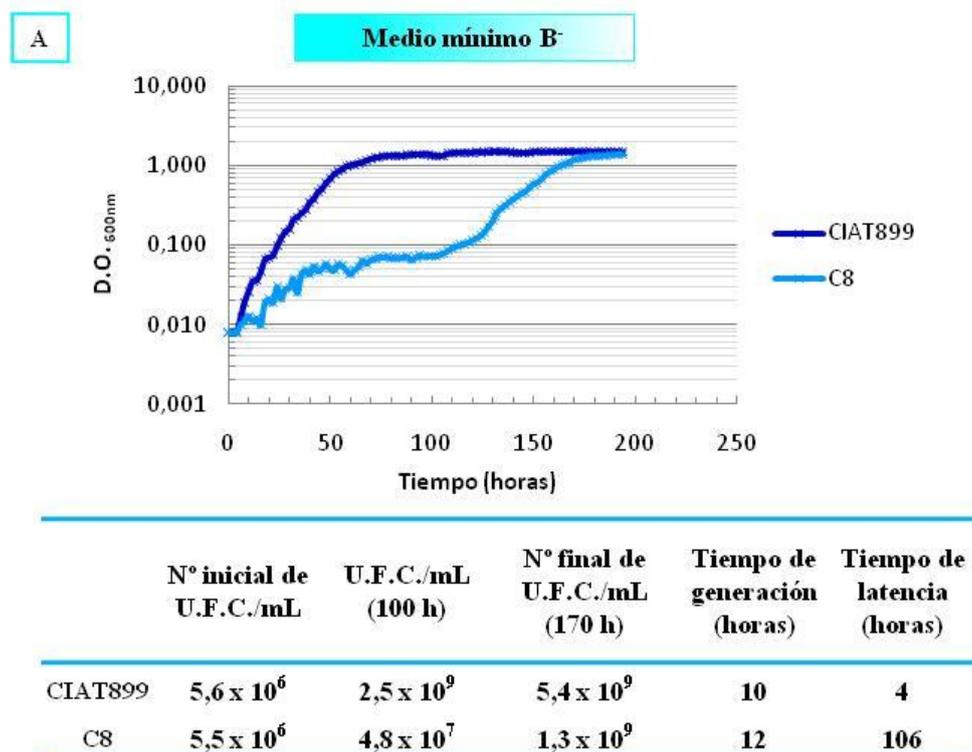
### 4.2. ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DEL MUTANTE C8.-

Por ser el medio de referencia usado para estudiar la producción de factores Nod en esta Tesis, se analizó el crecimiento del mutante C8 frente al de CIAT899 en medio

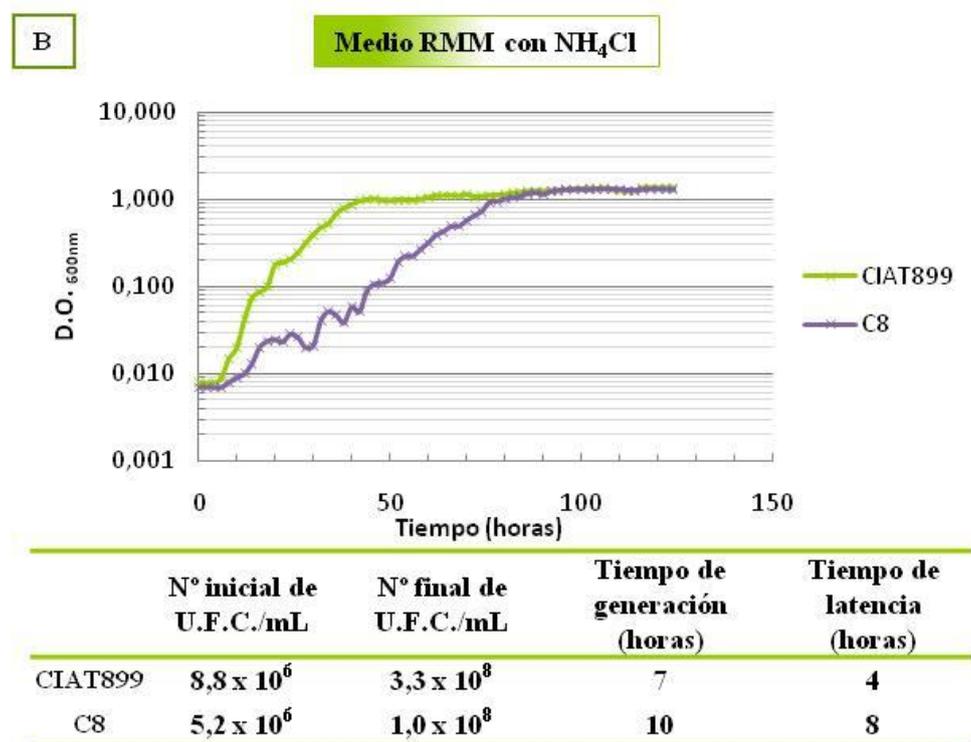
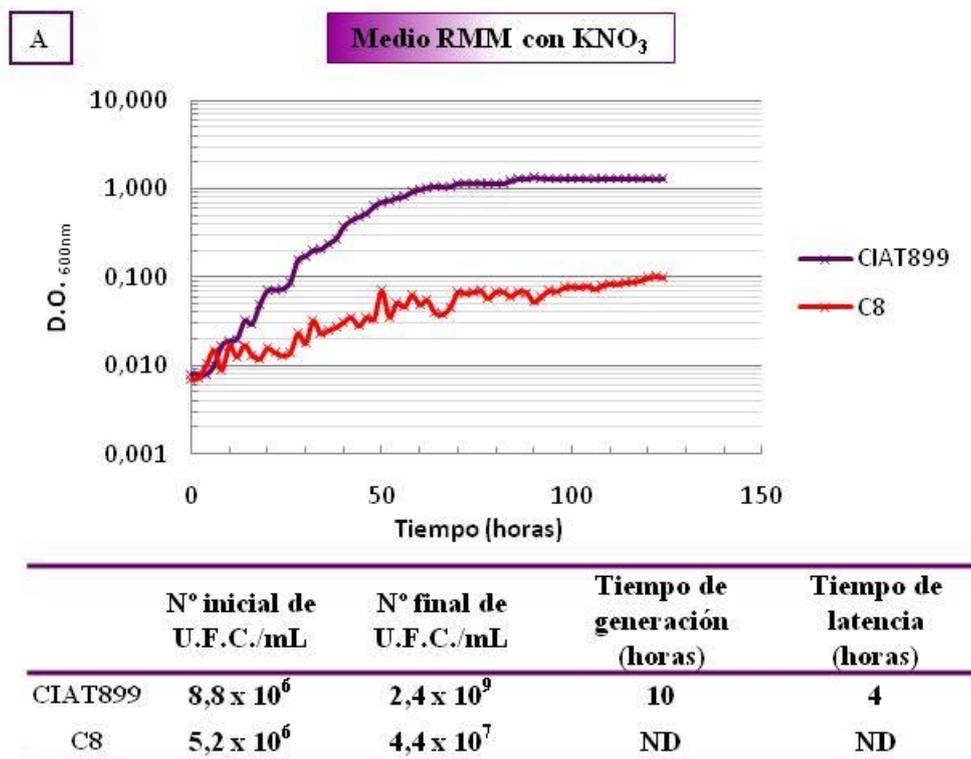
mínimo B<sup>-</sup> con y sin NaCl 300 mM. Este medio contiene KNO<sub>3</sub> y Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> como fuentes de nitrógeno y manitol como fuente de carbono. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura R18**. Como se puede apreciar en el **panel A**, a diferencia de CIAT899, el mutante C8 permaneció en fase de latencia durante aproximadamente cinco días (~ 100 horas) en medio B<sup>-</sup> y su número de células viables sólo aumentó en un orden de magnitud (~ 10<sup>7</sup> U.F.C./mL) durante todo ese tiempo. Sin embargo, tras cinco días de cultivo, C8 creció con la misma velocidad que CIAT899 y alcanzó el mismo orden de magnitud en el número de células viables final del cultivo (~ 10<sup>9</sup> U.F.C./mL). Además, como se observa en el **panel B**, CIAT899 duplicó su población en 21 horas cuando creció en medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM. Sin embargo, el mutante C8 creció muy lentamente en estas condiciones, aumentando su número de células viables sólo en un orden de magnitud al finalizar el experimento (~ 10<sup>7</sup> U.F.C./mL).

Por otra parte, dada la implicación del gen *glnD* en la regulación del metabolismo del nitrógeno celular, nos propusimos estudiar la influencia de la inserción sobre el crecimiento de CIAT899 con diferentes fuentes de nitrógeno. Para ello, se analizó el crecimiento del mutante C8 frente al de la estirpe silvestre en medio mínimo RMM, conteniendo KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl o glutamina como fuentes de nitrógeno, y manitol como fuente de carbono.

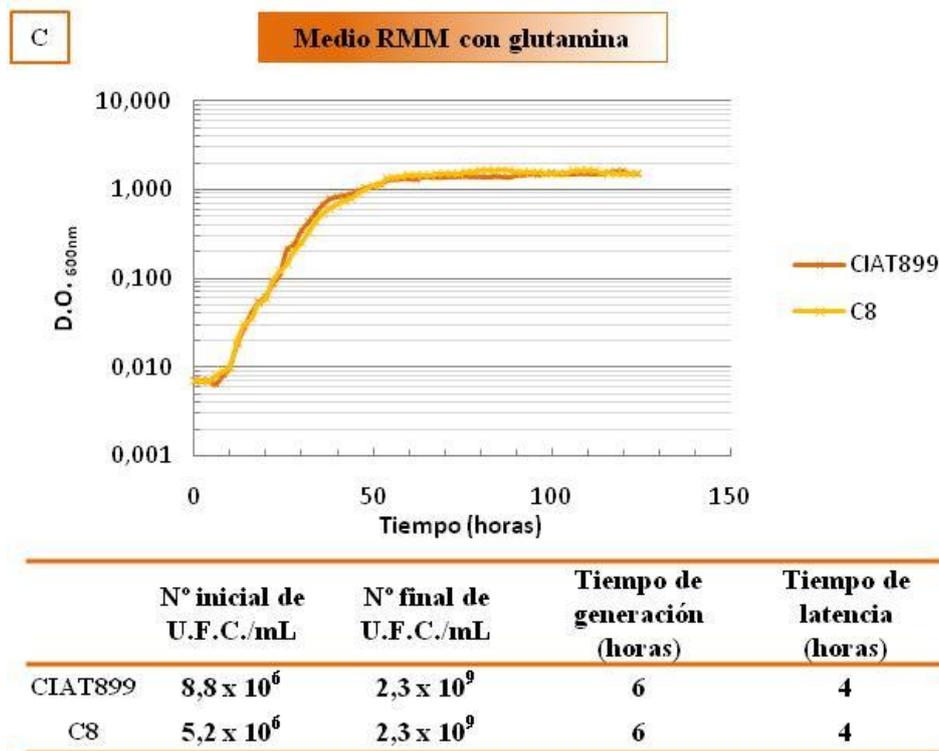
Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura R19**. Como se aprecia en el **panel A**, el mutante C8 creció muy lentamente respecto a CIAT899 cuando la única fuente de nitrógeno fue KNO<sub>3</sub>. Como se observa en la tabla inferior a la curva, el número de células viables del mutante C8 sólo aumentó en un orden de magnitud exponencial frente a los tres órdenes de magnitud que aumentó en CIAT899 durante todo el ensayo (~ 120 horas). Por otra parte, en el **panel B** se observa que C8 creció a menor velocidad que CIAT899 cuando la única fuente de nitrógeno fue NH<sub>4</sub>Cl, y su tiempo de generación fue de 10 horas frente a las 7 horas de CIAT899. En este caso, el número de células viables alcanzado fue del mismo orden de magnitud en ambas estirpes (~ 10<sup>8</sup> U.F.C./mL). Finalmente, en el **panel C** se observa que el mutante C8 se comportó igual que CIAT899 cuando se empleó glutamina como única fuente de nitrógeno, y el tiempo de generación y el número de células viables alcanzaron valores similares en ambas estirpes (6 horas y ~ 10<sup>9</sup> U.F.C./mL, respectivamente).



**Figura R18.-** Curvas y parámetros de crecimiento de *R. tropici* CIAT899 y del mutante C8 en medio B<sup>-</sup> (panel A) y medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM (panel B). Las medidas corresponden a la media de tres repeticiones independientes. El valor de la desviación estándar en cada punto no fue superior a 0,07 unidades. ND: no determinado.



**Figura R19.-** Curvas y parámetros de crecimiento de *R. tropici* CIAT899 y del mutante C8 en medio RMM con  $\text{KNO}_3$  (panel A),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (panel B) y glutamina (panel C) como únicas fuentes de nitrógeno. Las medidas corresponden a la media de tres repeticiones independientes. El valor de la desviación estándar en cada punto no fue superior a 0,07 unidades. ND: no determinado.

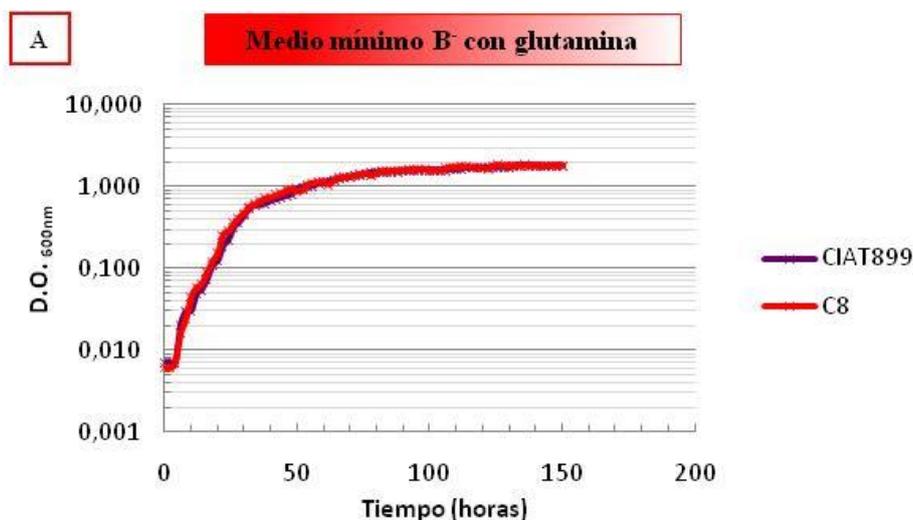


**Continuación figura R19.-** Curvas y parámetros de crecimiento de *R. tropici* CIAT899 y del mutante C8 en medio RMM con KNO<sub>3</sub> (**panel A**), NH<sub>4</sub>Cl (**panel B**) y glutamina (**panel C**) como únicas fuentes de nitrógeno. Las medidas corresponden a la media de tres repeticiones independientes. El valor de la desviación estándar en cada punto no fue superior a 0,07 unidades. ND: no determinado.

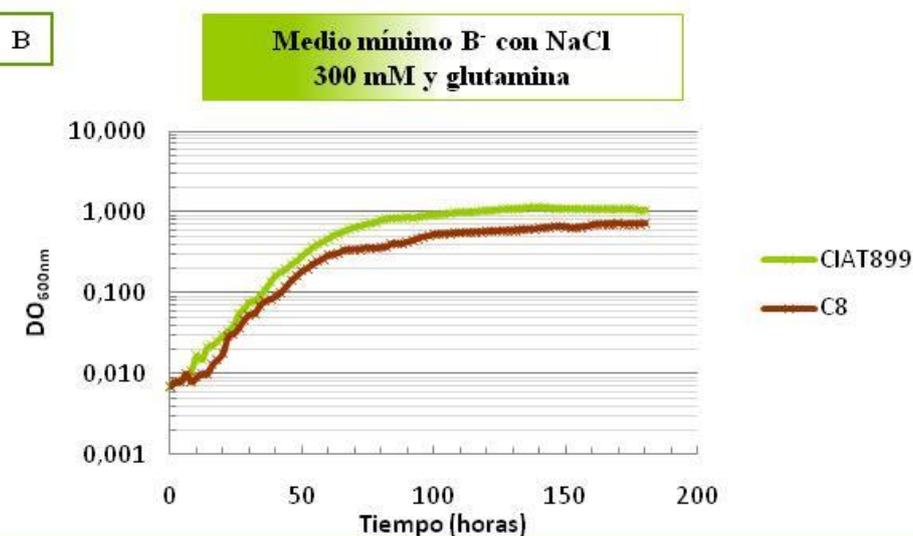
Dado que el mutante C8 presentó un crecimiento similar al de CIAT899 en medio RMM con glutamina, a continuación se analizó su crecimiento en medio mínimo B<sup>-</sup> al que se añadió glutamina (**Figura R20**). Como se puede observar, de modo similar a lo que ocurrió en el medio RMM, la presencia de la glutamina como fuente adicional de nitrógeno en el medio B<sup>-</sup> corrigió el defecto de crecimiento del mutante C8, pues creció igual que CIAT899 en estas condiciones. Como se observa en el **panel B** de la **Figura R20**, C8 también creció igual que CIAT899 en medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM y glutamina. Estos resultados indican que la mutación del gen *glnD* no afecta al crecimiento de *R. tropici* CIAT899 en presencia de glutamina.

#### 4.2.1. ESTUDIO DE LA ASIMILACIÓN DE NITRATO EN EL MUTANTE C8.-

Como se ha visto en el Apartado anterior, la mutación del gen *glnD* afecta a la capacidad de crecimiento de *R. tropici* CIAT899 cuando se emplea NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como única fuente de nitrógeno. Para averiguar si la mutación afecta a la capacidad de asimilación del NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, se tomaron alícuotas de cultivos de CIAT899 y del mutante C8 crecidos en



	Nº inicial de U.F.C./mL	Nº final de U.F.C./mL	Tiempo de generación (horas)	Tiempo de latencia (horas)
CIAT899	$5,6 \times 10^6$	$5,1 \times 10^9$	6	4
C8	$5,5 \times 10^6$	$5,4 \times 10^9$	6	4



	Nº inicial de U.F.C./mL	Nº final de U.F.C./mL	Tiempo de generación (horas)	Tiempo de latencia (horas)
CIAT899	$5,4 \times 10^6$	$5,8 \times 10^9$	14	6
C8	$5,3 \times 10^6$	$5,7 \times 10^9$	14	6

**Figura R20.-** Curvas y parámetros de crecimiento de *R. tropici* CIAT899 y del mutante C8 en medio B con glutamina (**panel A**) y en medio B con glutamina y NaCl 300 mM (**panel B**). Las medidas corresponden a la media de tres repeticiones independientes. El valor de la desviación estándar en cada punto no fue superior a 0,06 unidades.

medio RMM con  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y glutamina como únicas fuentes de nitrógeno, hasta una D.O. a 600 nm próxima a 0,5, y se investigó la capacidad de reducir el nitrato a nitrito mediante el ensayo de la nitrato reductasa.

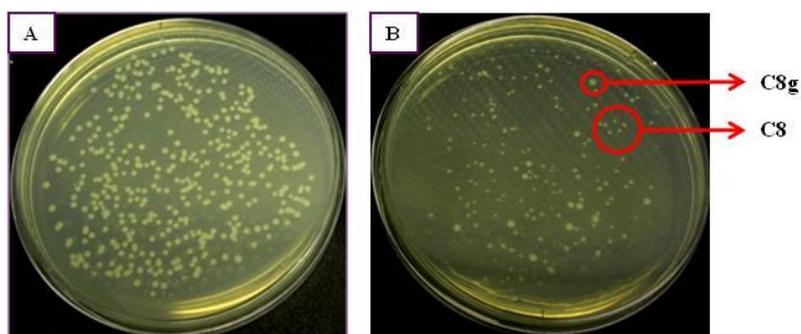
La presencia de  $\text{KNO}_3$  en el medio de cultivo indujo la actividad nitrato reductasa en CIAT899, detectándose nitritos en el medio tras su crecimiento (color rojo). En cambio, la reacción fue negativa en el mutante C8 y el color rojo que apareció tras la adición de polvo de zinc indicó que C8 es incapaz de usar los nitratos como única fuente de nitrógeno. Cuando se emplearon  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y glutamina como fuentes de nitrógeno en el medio todas las reacciones fueron negativas tanto en CIAT899 como en C8. A raíz de estos resultados podemos afirmar que, a diferencia de lo que ocurre en CIAT899, el mutante C8 no asimila los nitratos presentes en el medio de cultivo.

### 4.2.2. INESTABILIDAD DE LA INSERCIÓN EN MEDIO MÍNIMO B<sup>-</sup>.

Todos los mutantes derivados de CIAT899[pMP240] por inserción del transposón Tn5-Mob desarrollaron colonias de menor tamaño que las de CIAT899 cuando se cultivan durante el mismo tiempo y en las mismas condiciones. Al comienzo del **Apartado 4.2** se puso de manifiesto que el mutante C8 crece inicialmente muy lentamente frente a CIAT899 en medio B<sup>-</sup>, posiblemente debido a la presencia de los nitratos [ $\text{KNO}_3$  y  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ] como única fuente de nitrógeno (**Figura R18**). Como era de esperar, las colonias que se aislaban a partir del cultivo líquido del mutante C8 tenían menor tamaño que las de CIAT899. Por otra parte, como se mostró en la **Figura R18**, cuando se prolonga el tiempo de cultivo en medio B<sup>-</sup> más de cinco días, el mutante C8 crece y lo hace a la misma velocidad que CIAT899. Además, en estas condiciones se observó un fenómeno peculiar en cuanto a la morfología de las colonias que se aislaban del cultivo de C8. Como se muestra en la **Figura R21**, tras cultivar a C8 durante más de cinco días en medio B<sup>-</sup> con kanamicina, las colonias que se aislaron en placas de TY eran de dos tamaños distintos, aunque de apariencia similar a las colonias de CIAT899 en cuanto a color y brillo de la mucosidad.

Se observó que, tras 6 días de cultivo del mutante C8 en medio B<sup>-</sup>, aproximadamente un 7% de las células viables desarrollaron colonias de igual tamaño que las de un cultivo paralelo de CIAT899, y se las denominó C8g, mientras que el resto de las colonias (93%) tenía un tamaño menor que el de CIAT899 e igual que el de las colonias aisladas durante los primeros días de cultivo. Cuando se tomaron los clones de mayor tamaño (C8g) y se cultivaron de nuevo en medio B<sup>-</sup> líquido para

posteriormente aislar colonias en medio sólido, todas ellas crecieron bien y desarrollaron colonias con el tamaño de la estirpe silvestre. Sin embargo, cuando se cultivaron clones de pequeño tamaño (clones tipo C8) en medio B<sup>-</sup> líquido y se aislaron colonias a partir de los cultivos, se observó el mismo retraso de 5 días en el crecimiento y el mismo fenómeno de la aparición de colonias de dos tamaños distintos tras varios días de cultivo.

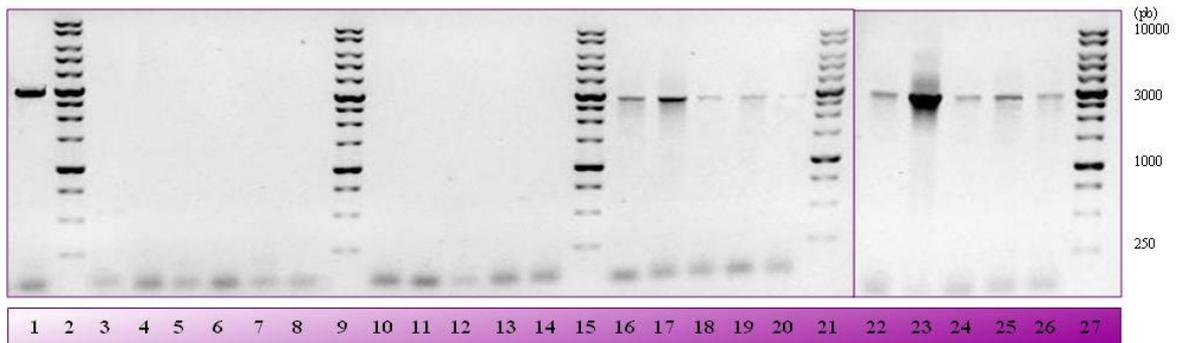


**Figura R21.-** Morfología de las colonias de *R. tropici* CIAT899 (**panel A**) y del mutante C8 (**panel B**) aisladas a partir de cultivos crecidos en medio B<sup>-</sup> durante 6 días. Las colonias del mutante C8 son de menor tamaño que las de CIAT899, aunque el 7% adquiere un tamaño similar al de CIAT899 (C8g). La fotografía se tomó a los tres días de incubación de las placas a 28°C.

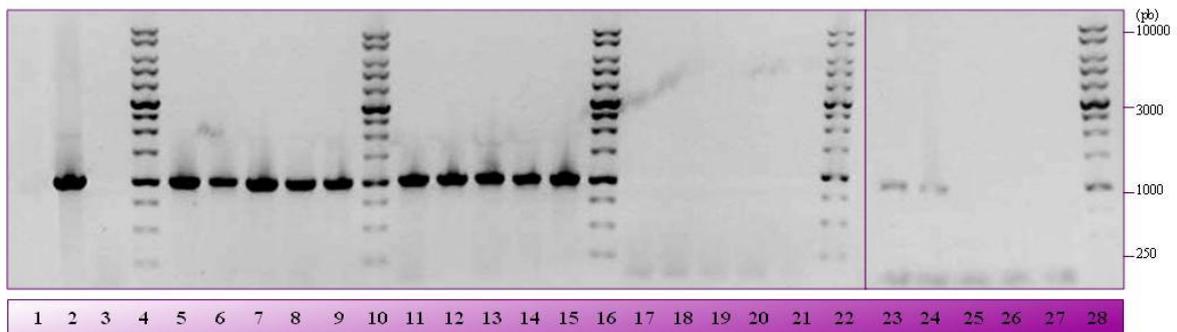
Para estudiar este fenómeno en mayor profundidad, se amplificó el gen *glnD* y el fragmento del gen de resistencia a la kanamicina de Tn5-Mob en 10 colonias grandes (C8g) y 10 colonias pequeñas (tipo C8) que se escogieron al azar de entre las aisladas a partir de un cultivo del mutante C8 crecido en medio B<sup>-</sup> con kanamicina durante 6 días. Como se observa en la **Figura R22**, cuando se usaron los cebadores GlnD-5 y GlnD-3 no hubo amplificación en ninguna de las colonias pequeñas (**carriles 4 a 8 y 10 a 14**). En cambio, en las 10 colonias de mayor tamaño se obtuvo una banda de ~3 kb de tamaño correspondiente al tamaño del gen *glnD* (**carriles 16 a 20 y 22 a 26**).

Posteriormente, se comprobó la presencia del transposón Tn5-Mob en cada una de las colonias escogidas amplificando un fragmento de ~0,9 kb del gen de resistencia a la kanamicina, contenido en el transposón Tn5-Mob, utilizando los cebadores Kan-F y Kan-R. Como se observa en la **Figura R23**, en todas las colonias de tamaño pequeño que se analizaron se amplificó el fragmento del gen de la kanamicina (**carriles 5 a 9 y 11 a 15**), por lo que debían ser portadoras del transposón Tn5-Mob en *glnD*. Sin embargo, sólo en dos de las colonias de mayor tamaño analizadas se amplificó este fragmento (**carriles 23 y 24**), lo que indicó que la mayoría de las colonias de mayor tamaño que se escogieron no tenían el gen de resistencia del transposón.

## Resultados

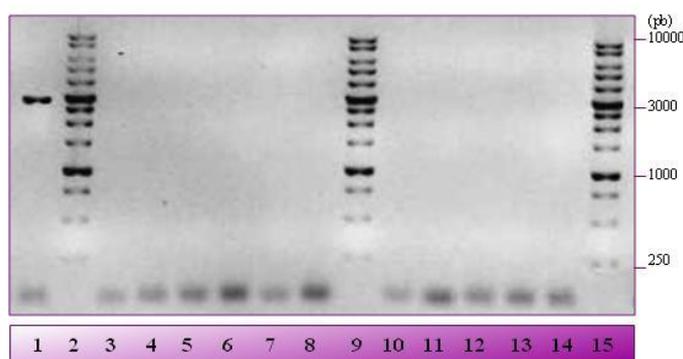


**Figura R22.-** Amplificación mediante PCR del gen *glnD* de *R. tropici* CIAT899 utilizando los cebadores GlnD-5 y GlnD-3 y tomando como molde ADN genómico de *R. tropici* CIAT899 y de 20 colonias aisladas de un cultivo del mutante C8 crecido en medio B<sup>-</sup> con kanamicina durante 6 días. **Carril 1.-** ADN genómico de CIAT899, **carriles 2, 9, 15, 21 y 27.-** marcador de 1 kb, **carril 3.-** control sin ADN, **carriles 4 a 8 y 19 a 14.-** colonias pequeñas y **carriles 16 a 20 y 22 a 26.-** colonias grandes. Los tamaños del marcador (pb) se muestran a la derecha de la figura.

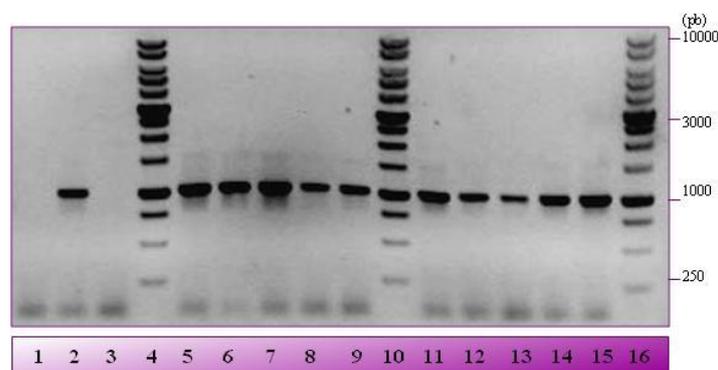


**Figura R23.-** Amplificación mediante PCR de un fragmento de ~ 0,9 kb del gen de resistencia a la kanamicina del transposón Tn5-Mob, utilizando los cebadores Kan-F y Kan-R y tomando como molde ADN genómico de *R. tropici* CIAT899 y de 20 colonias aisladas de un cultivo del mutante C8 crecido en medio B<sup>-</sup> con kanamicina durante 6 días. **Carril 1.-** ADN genómico de CIAT899, **carril 2.-** pMUS442, **carril 3.-** control sin ADN, **carriles 4, 10, 16, 22 y 28.-** marcador de 1 kb, **carriles 5 a 9 y 11 a 15.-** colonias pequeñas y **carriles 17 a 21 y 23 a 27.-** colonias grandes. Los tamaños del marcador (pb) se muestran a la derecha de la figura.

El fenómeno de la aparición de dos tipos de colonias en el mutante C8 no se observó cuando la bacteria se cultivó en medio B<sup>-</sup> suplementado con glutamina. En estas condiciones sólo se aislaban las colonias pequeñas características del mutante C8. En las **Figuras R24 y R25**, se muestran los resultados de las amplificaciones del gen *glnD* y del fragmento del gen de resistencia a la kanamicina en 10 colonias escogidas al azar de entre las aisladas de un cultivo del mutante C8 crecido en medio B<sup>-</sup> con glutamina y kanamicina. Todas las colonias obtenidas fueron pequeñas y en ellas no se amplificó el gen *glnD* (**Figura R24**), aunque sí el fragmento del gen de la resistencia a la kanamicina (**Figura R25**). Estos resultados indican que el mutante C8 mantiene el transposón en el gen *glnD* en medio B<sup>-</sup> con glutamina y kanamicina.



**Figura R24.-** Amplificación mediante PCR del gen *glnD* de *R. tropici* CIAT899 utilizando los cebadores GlnD-5 y GlnD-3 y tomando como molde ADN genómico de *R. tropici* CIAT899 y de 10 colonias aisladas de un cultivo del mutante C8 crecido en medio B<sup>-</sup> con kanamicina y con glutamina durante 6 días. **Carril 1.-** ADN genómico de CIAT899, **carriles 2, 9 y 15.-** marcador de 1 kb, **carril 3.-** control sin ADN y **carriles 4 a 8 y 10 a 14.-** colonias (pequeñas) del mutante C8. Los tamaños del marcador (pb) se muestran a la derecha de la figura.



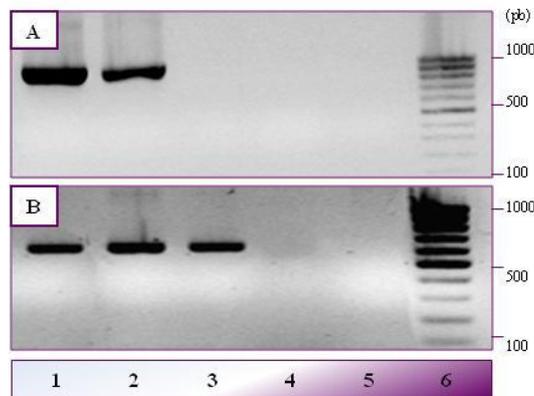
**Figura R25.-** Amplificación mediante PCR del gen de resistencia a la kanamicina del transposón Tn5-Mob, utilizando los cebadores Kan-F y Kan-R y tomando como molde ADN genómico de *R. tropici* CIAT899 y de 10 colonias aisladas de un cultivo del mutante C8 crecido en medio B<sup>-</sup> con kanamicina y con glutamina durante 6 días. **Carril 1.-** ADN genómico de CIAT899, **carril 2.-** pMUS442, **carril 3.-** control sin ADN, **carriles 4, 10 y 16.-** marcador de 1 kb y **carriles 5 a 9 y 11 a 15.-** colonias (pequeñas) del mutante C8. Los tamaños del marcador (pb) se muestran a la derecha de la figura.

#### 4.2.2.1. CARACTERIZACIÓN DE DOS CLONES SELECCIONADOS AL AZAR.-

Se tomaron al azar dos colonias de diferente tamaño de entre las aisladas de un cultivo del mutante C8 crecido en medio B<sup>-</sup> con kanamicina. Las colonias se sembraron en medio TY sólido con los antibióticos adecuados (Rif<sup>R</sup> y Km<sup>R</sup>) y, mediante amplificación por PCR se comprobó que mantenían características genéticas de CIAT899 y del mutante C8 del que derivaron. Como se observa en la **Figura R26**, los dos clones amplificaron un fragmento del gen de resistencia a la kanamicina del transposón Tn5-Mob (**panel A**) y un fragmento interno del gen *nodD1* de *R. tropici* CIAT899 (**panel B**).

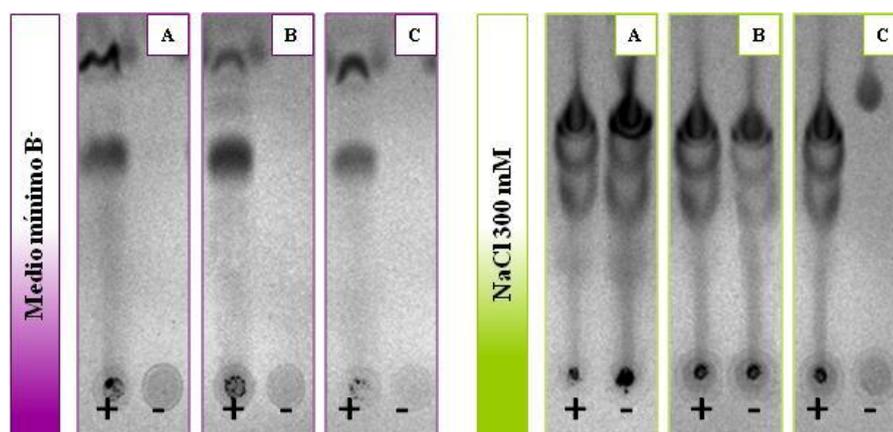
## Resultados

Los estudios del crecimiento en medio B<sup>-</sup>, con y sin glutamina, indicaron que ambos clones eran diferentes en esta característica. El clon C8g creció a la misma velocidad que CIAT899 con y sin glutamina. El clon tipo C8 creció muy lentamente sin glutamina durante todo el ensayo (~ 120 horas), pero con glutamina creció igual que CIAT899 (resultados no mostrados). Además, cuando se aislaron colonias de los distintos cultivos, las del clon C8g tuvieron el mismo tamaño que las de CIAT899 en todas las condiciones. Sin embargo, las colonias que se aislaron del clon tipo C8 fueron de dos tamaños distintos cuando procedían de los cultivos crecidos sin glutamina, y del mismo tamaño que las colonias de CIAT899 cuando procedían de los cultivos crecidos con glutamina.



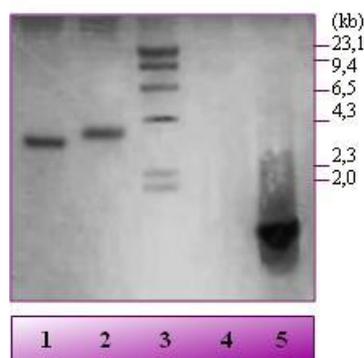
**Figura R26.-** Amplificación por PCR de un fragmento de ~ 0,9 kb del gen de resistencia a la kanamicina del transposón Tn5-Mob utilizando los cebadores Kan-F y Kan-R (**panel A**), y de un fragmento de ~ 650 pb del gen *nodD1* de *R. tropici* CIAT899 utilizando los cebadores CIATnodD-F y CIATnodD-R (**panel B**). Se tomó como molde el ADN genómico de *R. tropici* CIAT899 y de los dos clones del mutante C8. **Carriles 1.-** clon C8g, **carriles 2.-** clon tipo C8, **carriles 3.-** *R. tropici* CIAT899, **carriles 4.-** *S. fredii* SMH12, **carriles 5.-** control sin ADN y **carriles 6.-** marcador de 100 pb. Los tamaños del marcador (pb) se muestran a la derecha de la figura.

Además, se analizó el perfil de factores Nod de los dos clones en medio B<sup>-</sup> con y sin NaCl 300 mM y apigenina. Como se observa en la **Figura R27**, al igual que CIAT899 (**panel A**), los clones C8g y tipo C8 (**paneles B** y **C**, respectivamente) produjeron factores Nod en medio B<sup>-</sup> con apigenina. Sin embargo, en condiciones de estrés salino la respuesta de ambos clones fue distinta. El clon C8g (**panel B derecho**) presentó el fenotipo de CIAT899 (**panel A derecho**), ya que produjo factores Nod con NaCl y sin apigenina (carril negativo). En cambio, el clon tipo C8 (**panel C derecho**) presentó una producción de factores Nod muy reducida en estas condiciones, similar a la del mutante C8 del que proviene.



**Figura R27.-** Análisis mediante cromatografía en capa fina de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 y los dos clones del mutante C8 (C8g y tipo C8) en medio B<sup>-</sup> (panel izquierdo) y en medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM (panel derecho). **Paneles A.-** CIAT899, **paneles B.-** C8g y **paneles C.-** clon tipo C8. Los carriles con signo positivo corresponden a los cultivos inducidos con 1 µg/mL de apigenina.

Para determinar el número de copias del transposón Tn5-Mob y su localización en ambos clones, C8g y tipo C8, se realizó una hibridación de su ADN genómico digerido con *EcoRI* + *BamHI* usando como sonda el fragmento de ~ 0,9 kb del gen de resistencia a la kanamicina (**Figura R28**).



**Figura R28.-** Comprobación mediante hibridación de la inserción del transposón Tn5-Mob en el genoma del clon C8g y del clon tipo C8. El ADN genómico se digirió con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*. **Carril 1.-** ADN genómico de C8g, **carril 2.-** ADN genómico del clon tipo C8, **carril 3.-** marcador  $\lambda$ -*HindIII* marcado con digoxigenina, **carril 4.-** control sin ADN y **carril 5.-** pMUS442 digerido con la enzima *PstI* (control positivo). Los tamaños del marcador (kb) se muestran a la derecha de la figura.

En ambos casos una única banda hibridó con la sonda, pero a diferentes alturas, siendo de aproximadamente 3,8 kb de tamaño en C8g y de unas 4 kb de tamaño en el clon tipo C8. Estos fragmentos de ADN se clonaron en el plásmido pBlueScript y se

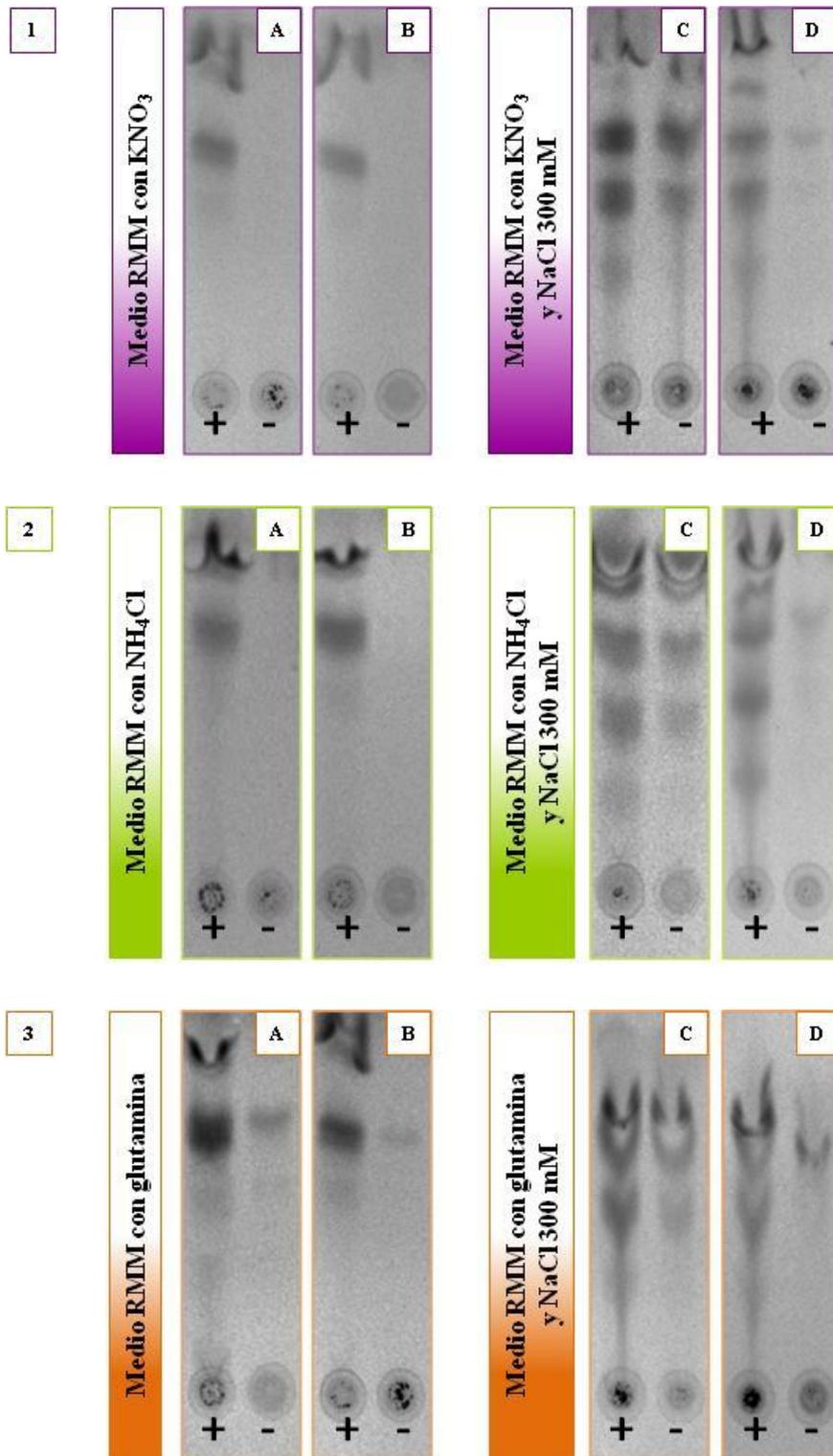
secuenciaron a partir de los cebadores M13 y Tn5F/Tn5FR. El análisis de las secuencias obtenidas mediante BLAST indicó, por una parte, que el clon C8g tenía el transposón Tn5-Mob inserto en un gen con un 78% de similitud con el gen que codifica una proteína implicada en la biosíntesis del citocromo c en *Rhizobium etli* y, por otra, que el clon tipo C8 tenía el transposón Tn5-Mob inserto en un gen 100% similar al gen *glnD* de *R. tropici* CIAT899.

### 4.3. ESTUDIO DE LOS FACTORES NOD PRODUCIDOS POR EL MUTANTE C8.-

#### 4.3.1. PERFIL DE FACTORES NOD DEL MUTANTE C8 EN MEDIO RMM CON DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO.-

Para determinar la existencia de una posible relación entre la producción de los factores Nod bajo estrés salino y el metabolismo del nitrógeno regulado por *glnD* en *R. tropici* CIAT899, se investigó si la reducción en la producción de factores Nod que se observa en el mutante C8 en medio B<sup>-</sup> con NaCl ocurre igualmente al emplear amonio y glutamina como únicas fuentes de nitrógeno. Para ello, se comparó el perfil de producción de factores Nod de CIAT899 y de C8 en medio RMM con KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl o glutamina como fuentes de nitrógeno, con y sin NaCl 300 mM, empleando apigenina como flavonoide inductor. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura R29**.

Como se observa en los **paneles 1A, 2A y 3A**, al crecer en medio RMM sin NaCl, CIAT899 produjo factores Nod con apigenina con independencia de la fuente de nitrógeno empleada (**carriles positivos**). Además, cuando se empleó la glutamina como fuente de nitrógeno se detectó una leve marca radiactiva en el carril correspondiente al cultivo crecido sin apigenina (**panel 3A, carril negativo**). Por otro lado, en los **paneles 1C, 2C y 3C**, se puede observar que, también con independencia de la fuente de nitrógeno empleada, CIAT899 produjo factores Nod con NaCl 300 mM incluso en ausencia de apigenina (**carriles negativos**). El perfil de producción de los factores Nod del mutante C8 en ausencia de estrés fue similar al de CIAT899 con todas las fuentes de nitrógeno empleadas (**paneles 1B, 2B y 3B**). Sin embargo, en los **paneles 1D, 2D y 3D**, se puede apreciar que con independencia de la fuente de nitrógeno empleada, el mutante C8 está afectado en la producción de factores Nod con NaCl y sin apigenina (**carriles negativos**). La señal radiactiva detectada en esas condiciones fue inferior a la obtenida con NaCl y apigenina (**carriles positivos**) y diferente a la señal de CIAT899 en las mismas condiciones (**paneles 1C, 2C y 3C**).

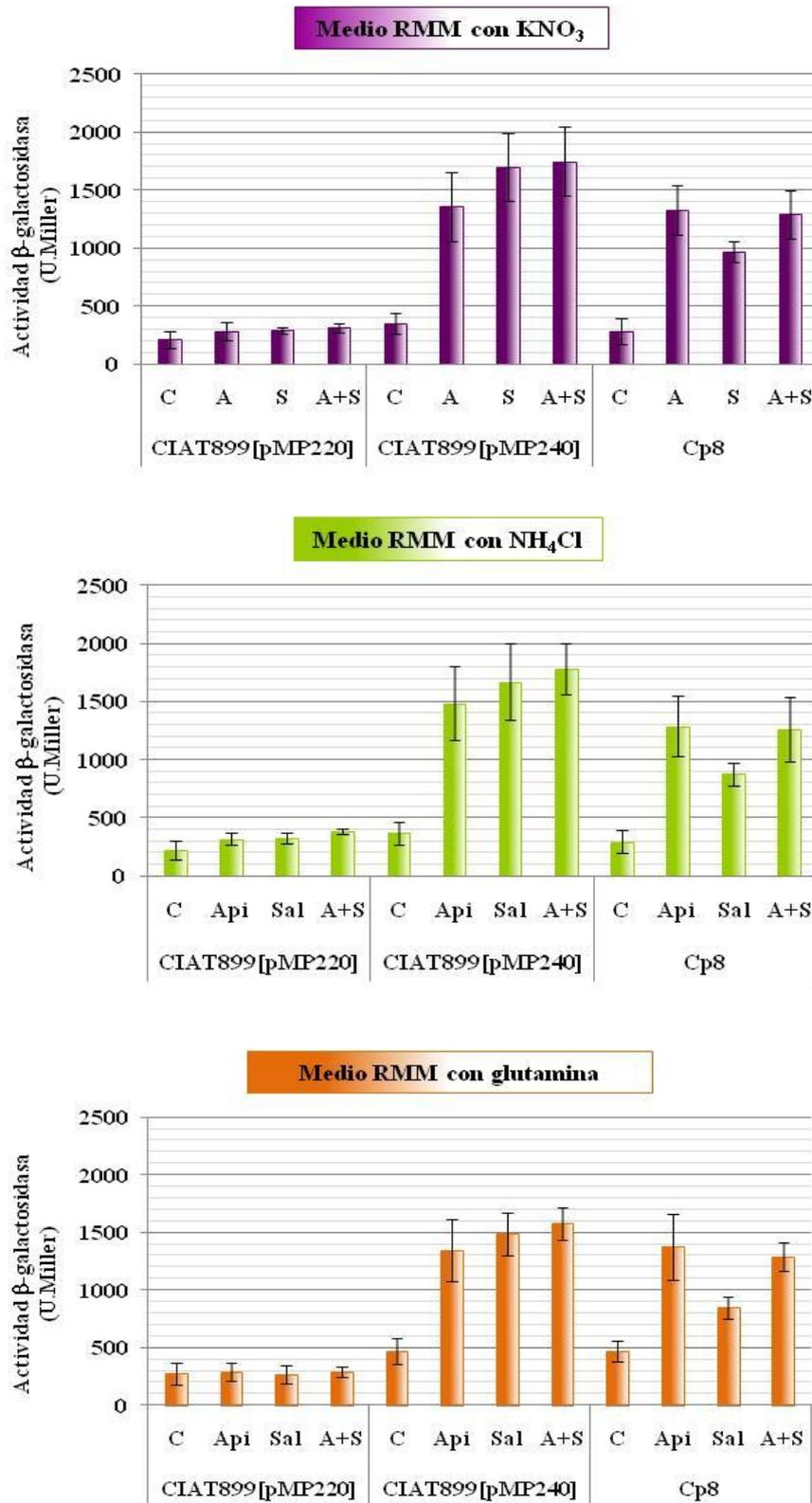


**Figura R29.-** Análisis mediante cromatografía en capa fina de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 y el mutante C8 en medio RMM con  $\text{KNO}_3$  (1),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2) y glutamina (3) como únicas fuentes de nitrógeno, sin NaCl y con NaCl 300 mM. **Paneles A y C.-** CIAT899, y **paneles B y D.-** mutante C8. Los carriles con signo positivo corresponden a los cultivos inducidos con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de apigenina.

En paralelo a los análisis mediante cromatografía en capa fina, se realizaron medidas de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de CIAT899[pMP240] y del mutante Cp8 en las mismas condiciones. Como control negativo de los ensayos se empleó la estirpe CIAT899[pMP220], indicadora del nivel de expresión basal del gen *lacZ*. Como se observa en la **Figura R30**, con independencia de la fuente de nitrógeno empleada, el nivel de actividad  $\beta$ -galactosidasa de CIAT899[pMP240] con estrés salino (**Sal** y **A+S**) mostró una tendencia a superar el conseguido con apigenina (**Api**), aunque sin mostrar diferencias significativas entre las distintas condiciones.

Con independencia de la fuente de nitrógeno empleada, el mutante Cp8 expresó los genes *nod* con apigenina (**Api**) a un nivel similar al de CIAT899. En todos los medios la expresión de los genes *nod* de Cp8 con estrés salino (**Sal**) fue significativamente inferior a su expresión con apigenina o con apigenina y NaCl (**Api** y **A+S**, respectivamente). En todos los medios la actividad  $\beta$ -galactosidasa de Cp8 con estrés salino (**Sal** y **A+S**) fue significativamente inferior a la de CIAT899[pMP240] en la misma condición (**Sal** y **A+S**). Cuando se empleó glutamina como fuente de nitrógeno, los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa obtenidos en CIAT899[pMP240] y en Cp8 en ausencia de inducción (**C**) no difirieron entre sí, pero fueron significativamente diferentes del nivel de actividad basal mostrado por CIAT899[pMP220].

Los resultados obtenidos sugieren que la mutación en el gen *glnD* afecta a la expresión de los genes *nod* y, en consecuencia, a la producción de factores Nod de *R. tropici* CIAT899 en medio RMM bajo estrés salino con independencia de la fuente de nitrógeno empleada en el crecimiento de la bacteria.

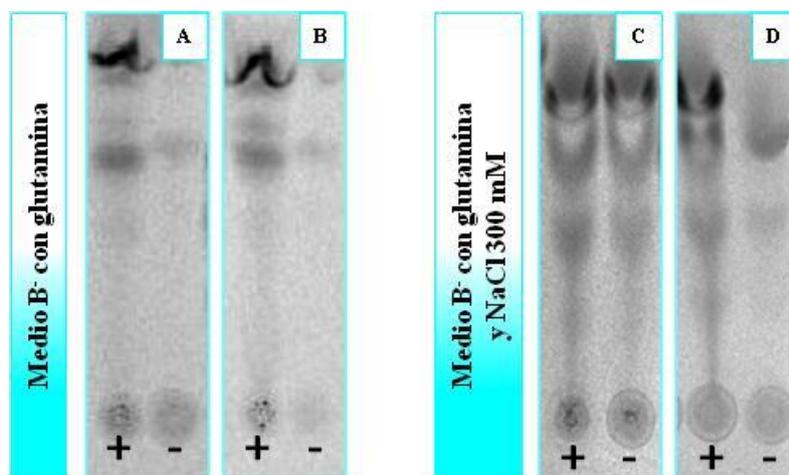


**Figura R30.-** Actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión transcripcional *pnodA::lacZ* del plásmido pMP240 en *R. tropici* CIAT899[pMP240] y en el mutante Cp8 en medio RMM con KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl y glutamina en condiciones control (C), con apigenina (1  $\mu$ g/mL) (Api), con NaCl 300 mM (Sal) y con apigenina y NaCl 300 mM (A+S). Como control negativo del ensayo se empleó la estirpe CIAT899[pMP220]. Las medidas de la actividad  $\beta$ -galactosidasa fueron realizadas por triplicado. Las barras verticales indican las desviaciones estándar.

### 4.3.2. PERFIL DE FACTORES NOD DEL MUTANTE C8 EN MEDIO MÍNIMO B<sup>-</sup> SUPLEMENTADO CON GLUTAMINA.-

Dado que en medio B<sup>-</sup> con glutamina el mutante C8 recuperó el crecimiento de la estirpe silvestre (**Figura R20**), decidimos estudiar en mayor profundidad el efecto de la mutación del gen *glnD* de *R. tropici* CIAT899 sobre la expresión de los genes *nod* y la consecuente producción de factores Nod cuando al medio B<sup>-</sup> se le añade glutamina. Para ello, se analizó el perfil de factores Nod y, en paralelo, se determinó la actividad β-galactosidasa de CIAT899[pMP240] y de Cp8 en medio B<sup>-</sup> suplementado con glutamina (1g/L), con y sin NaCl 300 mM y apigenina. Los resultados obtenidos se muestran en las **Figuras R31** y **R32**.

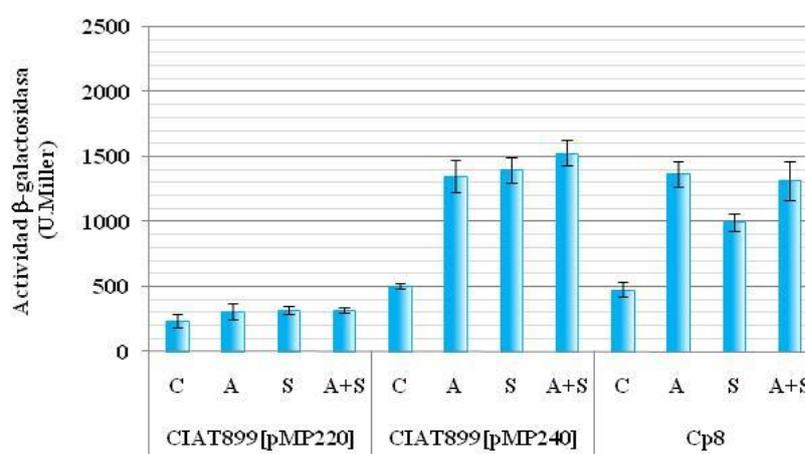
Como se aprecia en la **Figura R31**, la adición de glutamina al medio B<sup>-</sup> no afectó a la producción de factores Nod de CIAT899 ni del mutante C8 en ninguna de las condiciones, con la excepción de que, en ambos casos, se detectó una ligera señal radiactiva en ausencia de inductores (**paneles A y B, carriles negativos**). La adición de glutamina produjo una ligera mejora en la producción de factores Nod de C8 en medio B<sup>-</sup> con estrés salino pero sin llegar al nivel de producción de CIAT899 (**paneles C y D, carriles negativos**).



**Figura R31.-** Análisis mediante cromatografía en capa fina de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 y el mutante C8 en medio B<sup>-</sup> con glutamina en ausencia y presencia de NaCl 300 mM. **Paneles A y C.-** CIAT899, y **paneles B y D.-** C8. Los carriles con signo positivo corresponden a los cultivos inducidos con 1 µg/mL de apigenina.

Por otro lado, los resultados de los ensayos de actividad β-galactosidasa (**Figura R32**) muestran el mismo nivel de expresión de los genes *nod* en CIAT899[pMP240] y en Cp8 en ausencia de inductores (**C**), superándose de forma significativa el nivel de

expresión basal de CIAT899[pMP220]. Por otra parte, se observó un notable incremento de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en CIAT899[pMP240] y Cp8 con apigenina (**Api**) sin apreciarse diferencias significativas entre ambas estirpes. Asimismo, los valores de actividad de CIAT899[pMP240] obtenidos bajo estrés salino, con o sin apigenina (**A+S** y **Sal**, respectivamente), mostraron una tendencia a superar, sin diferir significativamente, el valor obtenido sólo con apigenina (**Api**). En cambio, la actividad de Cp8 con estrés salino (**Sal**) fue significativamente inferior a la registrada con apigenina (**Api** y **A+S**) y a la obtenida en CIAT899[pMP240] en la misma condición (**Sal**). Estos resultados ponen de manifiesto que la adición de glutamina al medio B<sup>-</sup> no complementa la actividad  $\beta$ -galactosidasa ni la producción de factores Nod del mutante C8 bajo estrés salino.



**Figura R32.-** Actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión transcripcional *pnodA::lacZ* del plásmido pMP240 en *R. tropici* CIAT899[pMP240] y el mutante Cp8 en medio B<sup>-</sup> con glutamina en condiciones control (**C**), con apigenina (1 $\mu$ g/mL) (**Api**), con NaCl 300 mM (**Sal**) y con apigenina y NaCl 300 mM (**A+S**). Como control negativo del ensayo se empleó la estirpe CIAT899[pMP220]. Las medidas de la actividad  $\beta$ -galactosidasa fueron realizadas por triplicado. Las barras verticales indican las desviaciones estándar.

#### 4.3.3. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS FACTORES NOD PRODUCIDOS POR EL MUTANTE C8.-

La estructura de los factores Nod producidos por el mutante C8 en medio B<sup>-</sup> se determinó mediante HPLC acoplada a Espectrometría de Masas en tándem, en colaboración con el grupo dirigido por el Profesor Gil Serrano. Los cromatogramas de HPLC obtenidos en las distintas condiciones se muestran en la **Figura R33**. Del conjunto de moléculas que se analizan mediante esta técnica, los factores Nod eluyen entre los 15 y los 18 minutos. Como se puede observar, en las tres condiciones se

## Resultados

detectaron señales en la zona del cromatograma correspondiente a los factores Nod, si bien, en condiciones de inducción por apigenina (**panel B**) el área de los picos observados fue mayor que sin inductores (**panel A**) y que en condiciones de estrés salino (**panel C**). La estructura de los diferentes factores Nod fue identificada asignando los diferentes espectros MS/MS obtenidos (**Tablas R3, R4 y R5**). Se identificaron un total de 4 factores Nod producidos por C8 en medio B<sup>-</sup> sin inductores (**Tabla R3**), 11 en medio B<sup>-</sup> con apigenina (**Tabla R4**) y 6 en medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM (**Tabla R5**). Para facilitar las comparaciones, todos ellos se han clasificado en función de la naturaleza de sus radicales (tipo 1: sin sustituyentes; tipo 2: sulfatados; tipo 3: *N*-metilados; tipo 4: manosilados; tipo 5: fucosilados o metil-fucosilados; tipo 6: acetilados o con grupo carbamoilo; tipo 7: con hexosa en el extremo reductor del esqueleto y tipo 8: sin *N*-acetilo en alguna glucosamina del esqueleto). Como se observa en la **Tabla R3**, los 4 factores Nod identificados en medio B<sup>-</sup> se caracterizan por su pequeño tamaño, siendo dos trímeros, un tetrámero y un pentámero, todos *N*-acilados en su extremo no reductor con un ácido graso saturado de 18 carbonos. Sólo se identificó el grupo *N*-metilo como sustituyente en el extremo no reductor (tipo 3) de uno de los oligosacáridos de tres unidades.

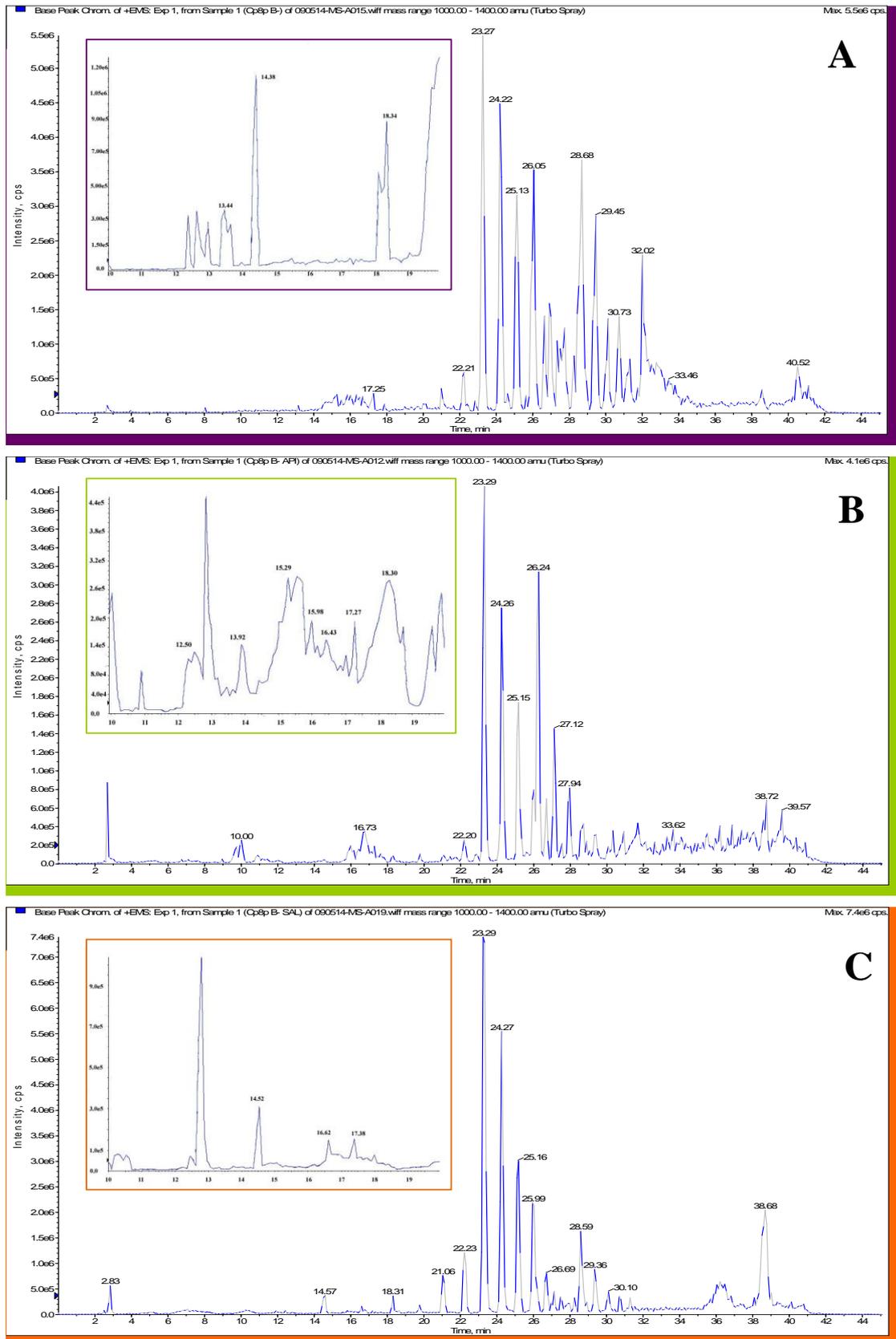
**Tabla R3.-** Análisis estructural de los factores Nod producidos por el mutante C8 en medio B<sup>-</sup> sin inductores.

Estructura	Tipo*	[M+H] <sup>+</sup> ( <i>m/z</i> )	Iones B <sub>n</sub>
III (C <sub>18:1</sub> )	1	850	426, 629
III (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3	864	440, 643
IV (C <sub>18:1</sub> )	1	1053	426, 629, 832
V (C <sub>18:1</sub> )	1	1256	426, 629, 832, 1035

Con números romanos se indica el número de unidades de GlcNAc que componen el esqueleto de los factores Nod. Entre paréntesis se indica la longitud y grado de insaturación del ácido graso y, en su caso, los distintos sustituyentes que presentan ordenados en sentido horario desde la posición del ácido graso (Spaink, 1992). NMe: *N*-metilo.

\*Tipo de sustituyentes. Tipo 1: sin sustituyentes; tipo 3: *N*-metilo.

Como se observa en la **Tabla R4**, la mayoría de los factores Nod identificados en presencia de apigenina fueron tetrámeros y pentámeros con un residuo de ácido graso, saturado o no, de 16 ó 18 carbonos en el extremo no reductor. Se identificaron los sustituyentes de algunas de las moléculas, siendo el grupo *N*-metilo el sustituyente más común en su extremo no reductor (tipo 3), apareciendo el grupo sulfato en el extremo reductor (tipo 2), y alguna glucosamina sin *N*-acetilo (tipo 8) en alguno de los grupos.



**Figura R33.-** Cromatogramas de HPLC-MS/MS de los factores Nod producidos por el mutante C8 en medio B<sup>-</sup> (**panel A**), medio B<sup>-</sup> con apigenina (1 µg/mL) (**panel B**) y medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM (**panel C**). En los recuadros se muestran las zonas correspondientes a los factores Nod. Eje de abscisas: tiempo (minutos) y eje de ordenadas: intensidad (cps).

## Resultados

De los 11 factores Nod identificados en estas condiciones, 3 fueron comunes a los identificados en medio B<sup>-</sup> sin inductores [III (C<sub>18:1</sub>), IV (C<sub>18:1</sub>) y V (C<sub>18:1</sub>)], siendo todos del tipo 1.

**Tabla R4.-** Análisis estructural de los factores Nod producidos por el mutante C8 en medio B<sup>-</sup> con apigenina (1 µg/mL).

Estructura	Tipo*	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Iones B <sub>n</sub>
III (C <sub>18:1</sub> )	1	850	426, 629
IV (C <sub>16:0</sub> )	1	1027	400, 603, 806
IV (C <sub>18:1</sub> )	1	1053	426, 629, 832
IV(C <sub>18:1</sub> , NMe)	3	1067	440, 643, 846
V(C <sub>16:0</sub> , NMe, dNAc)	3,8	1202	414, 820
V(C <sub>16:0</sub> )	1	1230	400, 603, 806
V (C <sub>16:1</sub> , NMe )	3	1242	412, 615, 818, 1021, 1224
V (C <sub>16:0</sub> , NMe )	3	1244	414, 617, 820, 1023, 1226
V(C <sub>18:1</sub> )	1	1256	426, 629, 832, 1035
V (C <sub>18:1</sub> , NMe )	3	1270	440, 643, 846, 1049
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	2,3	1350	440, 643, 846, 1049 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1270

Con números romanos se indica el número de unidades de GlcNAc que componen el esqueleto de los factores Nod. Entre paréntesis se indica la longitud y grado de insaturación del ácido graso y, en su caso, los distintos sustituyentes que presentan ordenados en sentido horario desde la posición del ácido graso (Spaink, 1992). NMe: *N*-metilo, S: sulfato, dNAc: sin *N*-acetilo. <sup>a</sup>[M-80]<sup>+</sup> = pérdida de grupo sulfato.

\*Tipo de sustituyentes. Tipo 1: sin sustituyentes; tipo 2: grupo sulfato; tipo 3: *N*-metilo y tipo 8: sin *N*-acetilo en alguna glucosamina.

Como se observa en la **Tabla R5**, los 6 factores Nod producidos por el mutante C8 con NaCl 300 mM fueron tetrámeros y pentámeros comunes a algunos de los identificados en las condiciones control y en medio B<sup>-</sup> con apigenina, excepto el grupo V (C<sub>18:1</sub>, NMe), que sólo fue identificado en los cultivos que crecieron con NaCl 300 mM. El grupo *N*-metilo apareció en el extremo no reductor de algunas moléculas (tipo 3). Los factores IV (C<sub>18:1</sub>) y V (C<sub>18:1</sub>), del tipo 1, fueron identificados en las tres condiciones analizadas.

En su conjunto, estos análisis permiten afirmar que el mutante C8 produce factores Nod en medio B<sup>-</sup> en todas las condiciones analizadas, y que la naturaleza química de los mismos es relativamente sencilla, produciéndose una mayor diversidad estructural con apigenina.

**Tabla R5.-** Análisis estructural de los factores Nod producidos por el mutante C8 en medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM.

Estructura	Tipo*	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Iones B <sub>n</sub>
IV (C <sub>16:0</sub> )	1	1027	400, 603, 806
IV (C <sub>18:1</sub> )	1	1053	426, 629, 832
V (C <sub>16:0</sub> , NMe)	3	1244	414, 617, 820, 1023, 1226
V (C <sub>18:1</sub> )	1	1256	426, 629, 832, 1035
V (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3	1270	440, 643, 846, 1049
V (C <sub>18:0</sub> , NMe)	3	1272	442, 645, 848, 1051

Con números romanos se indica el número de unidades de GlcNAc que componen el esqueleto de los factores Nod. Entre paréntesis se indica la longitud y grado de insaturación del ácido graso y, en su caso, los distintos sustituyentes que presentan ordenados en sentido horario desde la posición del ácido graso (Spaink, 1992). NMe: *N*-metilo.

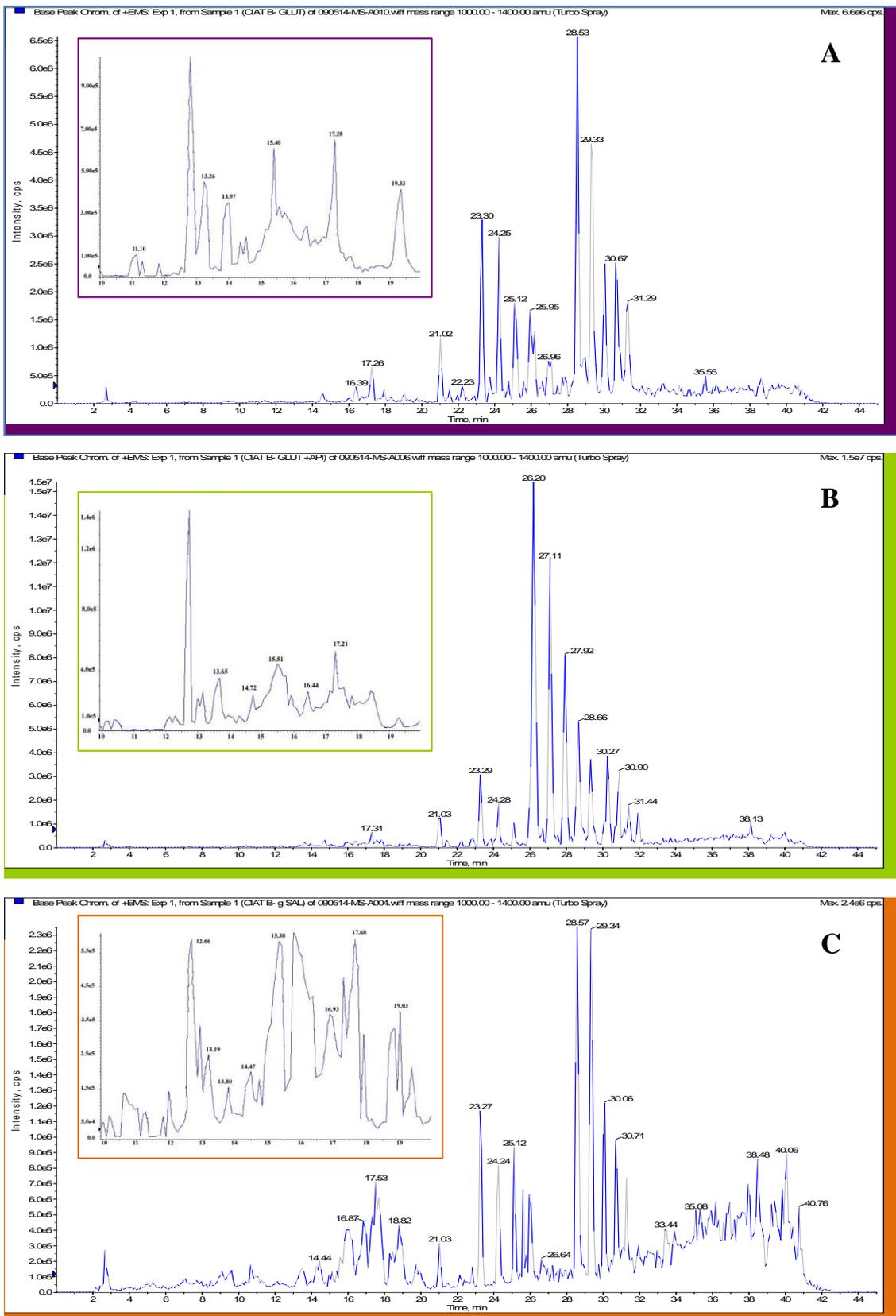
\*Tipo de sustituyentes. Tipo 1: sin sustituyentes y tipo 3: *N*-metilo.

#### 4.3.3.1. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS FACTORES NOD PRODUCIDOS POR *R. tropici* CIAT899 Y EL MUTANTE C8 EN MEDIO MÍNIMO B<sup>-</sup> CON GLUTAMINA.-

Quisimos conocer si existe o no alguna variación en los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 cuando se añade glutamina (1g/L) al medio mínimo B<sup>-</sup> para, posteriormente, establecer comparaciones con los factores producidos por el mutante C8 en las mismas condiciones. Para ello, se analizaron los factores Nod producidos por CIAT899 en medio B<sup>-</sup> con glutamina, con glutamina y apigenina (1 µg/mL) y con glutamina y NaCl 300 mM, mediante HPLC-MS/MS. Los cromatogramas de HPLC obtenidos se muestran en la **Figura R34**, y la estructura de los factores Nod identificados en cada una de las condiciones se muestra en las **Tablas R6, R7 y R8**, respectivamente.

Como se observa en la **Tabla R6**, se identificaron 13 factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 en medio B<sup>-</sup> con glutamina en ausencia de inductores. Se identificó un factor trimérico y varios tetrámeros y pentámeros de GlcNAc carentes de sustituyentes y con un ácido graso de 16 ó 18 carbonos en su extremo no reductor (tipo 1). Algunos de ellos presentaron el grupo sulfato (tipo 2) y/o el grupo *N*-metilo (tipo 3) como sustituyentes en su extremo reductor y no reductor, respectivamente. De las 13 moléculas identificadas, los factores IV(C<sub>18:1</sub>, S) y V(C<sub>18:1</sub>) fueron identificados exclusivamente sin inductores, en tanto que las 11 moléculas restantes fueron producidas por CIAT899 en todas las condiciones.

## Resultados



**Figura R34.-** Cromatogramas de HPLC-MS/MS de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 en medio B<sup>-</sup> con glutamina (**panel A**), medio B<sup>-</sup> con glutamina y apigenina (1 µg/mL) (**panel B**) y medio B<sup>-</sup> con glutamina y NaCl 300 mM (**panel C**). En los recuadros se muestran las zonas correspondientes a los factores Nod. Eje de abscisas: tiempo (minutos) y eje de ordenadas: intensidad (cps).

**Tabla R6.-** Análisis estructural de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 en medio B<sup>-</sup> con glutamina (1 g/L).

Estructura	Tipo*	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Iones B <sub>n</sub>
III (C <sub>18:1</sub> )	1	850	426, 629
IV (C <sub>14:0</sub> )	1	999	372, 575, 778
IV (C <sub>16:1</sub> )	1	1025	398, 601
IV (C <sub>16:0</sub> )	1	1027	400, 603, 806
IV (C <sub>18:1</sub> )	1	1053	426, 629, 832
IV (C <sub>18:0</sub> )	1	1055	428, 631, 834
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3	1067	440, 643, 846
IV (C <sub>18:1</sub> , S)	2	1133	426, 629, 832 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1053
V (C <sub>16:0</sub> , NMe)	3	1244	414, 617, 820, 1023, 1226
V (C <sub>18:1</sub> )	1	1256	426, 629, 832, 1035
V (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3	1270	440, 643, 846, 1049
V (C <sub>18:1</sub> , S)	2	1336	426, 629, 832, 1035 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1256
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	2,3	1350	440, 643, 846, 1049 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1270

Con números romanos se indica el número de unidades de GlcNAc que componen el esqueleto de los factores Nod. Entre paréntesis se indica la longitud y grado de insaturación del ácido graso y, en su caso, los distintos sustituyentes que presentan ordenados en sentido horario desde la posición del ácido graso (Spaink, 1992). NMe: *N*-metilo, S: sulfato. <sup>a</sup>[M-80]<sup>+</sup> = pérdida de grupo sulfato.

\*Tipo de sustituyentes. Tipo 1: sin sustituyentes; tipo 2: grupo sulfato y tipo 3: *N*-metilo.

Como se observa en la **Tabla R7**, se identificaron 26 factores Nod producidos por CIAT899 en medio B<sup>-</sup> con glutamina y apigenina; siendo 3 trímeros, 10 tetrámeros y 13 pentámeros de GlcNAc. En la mitad de las moléculas el esqueleto de GlcNAc carece de sustituyente alguno, a excepción del ácido graso de 14, 16 ó 18 carbonos del extremo no reductor (tipo 1). La otra mitad fueron factores Nod *N*-metilados en el terminal no reductor y sulfatados o no en el extremo reductor (tipos 3 y/ó 2). Los factores Nod III(C<sub>18:1</sub>), V(C<sub>14:0</sub>), IV(C<sub>18:0-OH</sub>) y V(C<sub>18:0-OH</sub>), del tipo 1, se identificaron exclusivamente en estas condiciones. Como se observa en la **Tabla R8**, se identificaron 28 factores Nod producidos por CIAT899 en medio B<sup>-</sup> con glutamina y NaCl 300 mM. De nuevo, la mayoría fueron tetrámeros y pentámeros de GlcNAc, identificándose también dos factores triméricos. Los radicales más comunes fueron los grupos *N*-metilo (tipo 3) y sulfato (tipo 2) en el extremo no reductor y reductor, respectivamente. Sólo 8 factores Nod carecieron de sustituyentes (tipo 1). Del total, 17 factores Nod fueron comunes a los identificados con apigenina, y los factores IV(C<sub>18:0</sub>, NMe), IV(C<sub>18:0</sub>,

## Resultados

NMe, S), IV(C<sub>18:1</sub>, NMe, S), V(C<sub>16:0</sub>, NMe, dNAc), V(C<sub>16:1</sub>, NMe, dNAc) y V(C<sub>20:1</sub>, NMe, S) se produjeron exclusivamente con estrés salino.

**Tabla R7.-** Análisis estructural de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 en medio B<sup>-</sup> con glutamina (1 g/L) y apigenina (1 µg/mL).

Estructura	Tipo*	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Iones B <sub>n</sub>
III (C <sub>18:1</sub> )	1	850	426, 629
III (C <sub>18:0</sub> )	1	852	428, 631
III (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3	864	440, 643
IV (C <sub>14:0</sub> )	1	999	372, 575, 778
IV (C <sub>14:0</sub> , NMe)	3	1013	386, 589, 792
IV (C <sub>16:1</sub> )	1	1025	398, 601, -
IV (C <sub>16:0</sub> )	1	1027	400, 603, 806
IV (C <sub>16:1</sub> , NMe)	3	1039	412, 615, 818
IV (C <sub>16:0</sub> , NMe)	3	1041	414, 617, 820
IV(C <sub>18:1</sub> )	1	1053	426, 629, 832
IV(C <sub>18:0</sub> )	1	1055	428, 631, 834
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3	1067	440, 643, 846
IV(C <sub>18:0</sub> -OH)	1	1071	444, 647, 850
V (C <sub>14:0</sub> )	1	1202	575, 778, 981
V (C <sub>14:0</sub> , NMe)	3	1216	386, 589, 792, 995
V(C <sub>18:1</sub> ,NMe, dNAc)	3, 8	1228	440, 643, 846
V (C <sub>16:0</sub> )	1	1230	400, 603, 806
V (C <sub>16:1</sub> , NMe)	3	1242	412, 615, 818, 1021, 1224
V (C <sub>16:0</sub> , NMe)	3	1244	414, 617, 820, 1023, 1226
V (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3	1270	440, 643, 846, 1049
V (C <sub>18:0</sub> , NMe)	3	1272	442, 645, 848, 1051
V(C <sub>18:0</sub> -OH)	1	1274	444, 647, 850, 1053
V (C <sub>16:0</sub> , NMe, S)	2,3	1324	414, 617, 820, 1023 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1244
V (C <sub>18:1</sub> , S)	2	1336	426, 629, 832, 1035 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1256
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	2,3	1350	440, 643, 846, 1049 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> = 1270
V (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	2,3	1352	442, 645, 848, 1051 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1272

Con números romanos se indica el número de unidades de GlcNAc que componen el esqueleto de los factores Nod. Entre paréntesis se indica la longitud y grado de insaturación del ácido graso y, en su caso, los distintos sustituyentes que presentan ordenados en sentido horario desde la posición del ácido graso (Spaink, 1992). NMe: *N*-metilo, S: sulfato, dNAc: sin *N*-acetilo. <sup>a</sup>[M-80]<sup>+</sup> = pérdida de grupo sulfato.

\*Tipo de sustituyentes. Tipo 1: sin sustituyentes; tipo 2: grupo sulfato; tipo 3: *N*-metilo y tipo 8: sin *N*-acetilo en alguna glucosamina.

**Tabla R8.-** Análisis estructural de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 en medio B<sup>-</sup> con glutamina (1 g/L) y NaCl 300 mM.

Estructura	Tipo*	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Iones B <sub>n</sub>
III (C <sub>18:1</sub> )	1	850	426, 629
III (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3	864	440, 643
IV (C <sub>14:0</sub> )	1	999	372, 575, 778
IV (C <sub>14:0</sub> , NMe)	3	1013	386, 589, 792
IV (C <sub>16:1</sub> )	1	1025	398, 601, -
IV (C <sub>16:0</sub> )	1	1027	400, 603, 806
IV (C <sub>16:1</sub> , NMe)	3	1039	412, 615, 818
IV (C <sub>16:0</sub> , NMe)	3	1041	414, 617, 820
IV(C <sub>18:1</sub> )	1	1053	426, 629, 832
IV(C <sub>18:0</sub> )	1	1055	428, 631, 834
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3	1067	440, 643, 846
IV (C <sub>18:0</sub> , NMe)	3	1069	442, 645, 848
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	2,3	1147	440, 643, 846 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1067
IV (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	2,3	1149	442, 645, 848 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1069
V(C <sub>16:1</sub> ,NMe, dNAc)	3,8	1200	412, -, 818, -
V(C <sub>16:0</sub> ,NMe, dNAc)	3,8	1202	414, 617, 820, 981, 1184
V (C <sub>14:0</sub> , NMe)	3	1216	386, 589, 792, 995
V(C <sub>18:1</sub> ,NMe, dNAc)	3,8	1228	440, 643, 846
V (C <sub>16:0</sub> )	1	1230	400, 603, 806
V (C <sub>16:1</sub> , NMe)	3	1242	412, 615, 818, 1021, 1224
V (C <sub>16:0</sub> , NMe)	3	1244	414, 617, 820, 1023, 1226
V (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3	1270	440, 643, 846, 1049
V (C <sub>18:0</sub> , NMe)	3	1272	442, 645, 848, 1051
V (C <sub>16:0</sub> , NMe, S)	2,3	1324	414, 617, 820, 1023 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1244
V (C <sub>18:1</sub> , S)	2	1336	426, 629, 832, 1035 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1256
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	2,3	1350	440, 643, 846, 1049 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> = 1270
V (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	2,3	1352	442, 645, 848, 1051 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1272
V(C <sub>20:1</sub> ,NMe,S)	2,3	1378	468, 671, 874, 1077 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1298

Con números romanos se indica el número de unidades de GlcNAc que componen el esqueleto de los factores Nod. Entre paréntesis se indica la longitud y grado de insaturación del ácido graso y, en su caso, los distintos sustituyentes que presentan ordenados en sentido horario desde la posición del ácido graso (Spaink, 1992). NMe: *N*-metilo, S: sulfato, dNAc: sin *N*-acetilo. <sup>a</sup>[M-80]<sup>+</sup> = pérdida de grupo sulfato.

\*Tipo de sustituyentes. Tipo 1: sin sustituyentes; tipo 2: grupo sulfato; tipo 3: *N*-metilo y tipo 8: sin *N*-acetilo en alguna glucosamina.

De igual manera se estudió la estructura de los factores Nod sintetizados por el mutante C8 en medio B<sup>-</sup> con glutamina, y se comparó con la de los factores producidos por CIAT899 identificados previamente. En la **Figura R35** se muestran los cromatogramas de HPLC y en las **Tablas R9, R10 y R11** las estructuras de los factores Nod que C8 sintetizó en cada una de las condiciones.

Como se observa en la **Tabla R9**, se identificaron 8 factores Nod producidos por C8 en medio B<sup>-</sup> con glutamina. Todos fueron factores Nod de estructura muy sencilla, con ácidos grasos de 16 ó 18 carbonos saturando su extremo no reductor y, en su mayoría, carentes de otros sustituyentes (tipo 1). Destacó el grupo sulfato y/o *N*-metilo en el extremo reductor y no reductor de algunas moléculas, respectivamente (tipos 2 y 3). Como se observa en la **Tabla R10**, el mutante C8 produjo 20 factores Nod diferentes en medio B<sup>-</sup> con glutamina y apigenina. La mayoría de los factores Nod identificados fueron tetrámeros y pentámeros de GlcNAc *N*-metilados en el extremo no reductor (tipo 3) y algunos sulfatados en el extremo reductor (tipo 2). Los factores IV(C<sub>14:0</sub>, NMe), IV(C<sub>16:0</sub>, NMe), IV(C<sub>16:1</sub>, NMe) y IV(C<sub>18:0</sub>, NMe) fueron producidos por C8 sólo en esta condición. Como se observa en la **Tabla R11**, en medio B<sup>-</sup> con glutamina y NaCl 300 mM el mutante C8 produjo 17 factores Nod. La mayoría tuvieron estructura sencilla y estuvieron *N*-metilados y/o portaban el grupo sulfato en su extremo no reductor y reductor, respectivamente (tipos 2 y 3).

En la **Tabla V del Apéndice** se ha recogido el estudio comparativo de los factores Nod producidos por CIAT899 y C8 con glutamina en las distintas condiciones. En ella se aprecia que 5 de los factores Nod producidos por CIAT899 en medio B<sup>-</sup> con glutamina fueron sintetizados también por C8. Los factores V(C<sub>16:0</sub>), V(C<sub>16:1</sub>) y V(C<sub>16:1</sub>,S) fueron producidos exclusivamente por el mutante C8. Además, 18 de los factores Nod producidos por CIAT899 con glutamina y apigenina fueron también producidos por C8 en la misma condición, siendo los factores IV (C<sub>18:0</sub>, NMe) y IV (C<sub>18:1</sub>, NMe, S) producidos exclusivamente por C8. Y 15 de los factores Nod producidos por CIAT899 con glutamina y NaCl 300 mM fueron producidos también por C8, siendo los factores V(C<sub>16:1</sub>) y V(C<sub>18:1</sub>) exclusivos del mutante en esta condición. Los factores Nod IV(C<sub>16:0</sub>), IV(C<sub>18:1</sub>) y V(C<sub>18:1</sub>, NMe, S) fueron producidos tanto por CIAT899 como por C8 en medio B<sup>-</sup> con glutamina en todas las condiciones.



## Resultados

En su conjunto, vemos que el mutante C8 produce menor diversidad estructural de factores Nod que la estirpe silvestre en todas las condiciones analizadas. Es decir, la mutación en el gen *glnD* afecta pero no suprime la producción de factores Nod en *R. tropici* CIAT899 en medio B<sup>-</sup> con glutamina.

**Tabla R9.-** Análisis estructural de los factores Nod producidos por el mutante C8 en medio B<sup>-</sup> con glutamina (1 g/L).

Estructura	Tipo*	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Iones B <sub>n</sub>
III (C <sub>18:1</sub> )	1	850	426, 629
IV (C <sub>16:0</sub> )	1	1027	400, 603, 806
IV (C <sub>18:1</sub> )	1	1053	426, 629, 832
IV (C <sub>18:0</sub> )	1	1055	428, 631, 834
V (C <sub>16:0</sub> )	1	1230	400, -, 806, -
V (C <sub>16:1</sub> )	1	1256	426, 629, 832, 1035
V (C <sub>16:1</sub> , S)	2	1336	426, 629, 832, 1035 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1244
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	2,3	1350	440, 643, 846, 1049 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1270

Con números romanos se indica el número de unidades de GlcNAc que componen el esqueleto de los factores Nod. Entre paréntesis se indica la longitud y grado de insaturación del ácido graso y, en su caso, los distintos sustituyentes que presentan ordenados en sentido horario desde la posición del ácido graso (Spaink, 1992). NMe: *N*-metilo, S: sulfato. <sup>a</sup>[M-80]<sup>+</sup> = pérdida de grupo sulfato.

\*Tipo de sustituyentes. Tipo 1: sin sustituyentes; tipo 2: grupo sulfato y tipo 3: *N*-metilo.

**Tabla R10.-** Análisis estructural de los factores Nod producidos por el mutante C8 en medio B<sup>-</sup> con glutamina (1 g/L) y apigenina (1 µg/mL).

Estructura	Tipo*	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Iones B <sub>n</sub>
III (C <sub>18:1</sub> )	1	850	426, 629
IV (C <sub>14:0</sub> )	1	999	372, 575, 778
IV (C <sub>14:0</sub> , NMe)	3	1013	386, 589, 792
IV (C <sub>16:1</sub> )	1	1025	398, 601, -
IV (C <sub>16:0</sub> )	1	1027	400, 603, 806
IV (C <sub>16:1</sub> , NMe)	3	1039	412, 615, 818
IV (C <sub>16:0</sub> , NMe)	3	1041	414, 617, 820, 1013
IV (C <sub>18:1</sub> )	1	1053	426, 629, 832
IV (C <sub>18:0</sub> )	1	1055	428, 631, 834
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3	1067	440, 643, 846
IV (C <sub>18:0</sub> , NMe)	3	1069	442, 645, 848
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	2,3	1147	440, 643, 846 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1067
V (C <sub>14:0</sub> , NMe)	3	1216	386, 589, 792, 995

Tabla R10.- Continuación

Estructura	Tipo*	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Iones B <sub>n</sub>
V (C <sub>16:1</sub> , NMe)	3	1242	412, 615, 818, 1021, 1224
V (C <sub>16:0</sub> , NMe)	3	1244	414, 617, 820, 1023, 1226
V (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3	1270	440, 643, 846, 1049
V (C <sub>18:0</sub> , NMe)	3	1272	442, 645, 848, 1051
V (C <sub>16:0</sub> , NMe, S)	2,3	1324	414, 617, 820, 1023 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1244
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	2,3	1350	440, 643, 846, 1049 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> = 1270
V (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	2,3	1352	442, 645, 848, 1051 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1272

Con números romanos se indica el número de unidades de GlcNAc que componen el esqueleto de los factores Nod. Entre paréntesis se indica la longitud y grado de insaturación del ácido graso y, en su caso, los distintos sustituyentes que presentan ordenados en sentido horario desde la posición del ácido graso (Spaink, 1992). NMe: *N*-metilo, S: sulfato. <sup>a</sup>[M-80]<sup>+</sup> = pérdida de grupo sulfato.

\*Tipo de sustituyentes. Tipo 1: sin sustituyentes; tipo 2: grupo sulfato y tipo 3: *N*-metilo.

Tabla R11.- Análisis estructural de los factores Nod producidos por el mutante C8 en medio B<sup>-</sup> con glutamina (1 g/L) y NaCl 300 mM.

Estructura	Tipo*	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Iones B <sub>n</sub>
IV (C <sub>14:0</sub> )	1	999	372, 575, 778
IV (C <sub>16:1</sub> )	1	1025	398, 601, -
IV (C <sub>16:0</sub> )	1	1027	400, 603, 806
IV(C <sub>18:1</sub> )	1	1053	426, 629, 832
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3	1067	440, 643, 846
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	2,3	1147	440, 643, 846 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1067
V (C <sub>16:1</sub> )	1	1228	398, 601, 804, 1007
V (C <sub>16:0</sub> )	1	1230	400, 603, 806
V (C <sub>16:1</sub> , NMe)	3	1242	412, 615, 818, 1021, 1224
V (C <sub>16:0</sub> , NMe)	3	1244	414, 617, 820, 1023, 1226
V (C <sub>18:1</sub> )	1	1256	-, 629, 832, -
V (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3	1270	440, 643, 846, 1049
V (C <sub>18:0</sub> , NMe)	3	1272	442, 645, 848, 1051
V (C <sub>16:0</sub> , NMe, S)	2,3	1324	414, 617, 820, 1023 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1244
V (C <sub>18:1</sub> , S)	2	1336	426, 629, 832, 1035 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1256
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	2,3	1350	440, 643, 846, 1049 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> = 1270
V (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	2,3	1352	442, 645, 848, 1051 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1272

Con números romanos se indica el número de unidades de GlcNAc que componen el esqueleto de los factores Nod. Entre paréntesis se indica la longitud y grado de insaturación del ácido graso y, en su caso, los distintos sustituyentes que presentan ordenados en sentido horario desde la posición del ácido graso (Spaink, 1992). NMe: *N*-metilo, S: sulfato. <sup>a</sup>[M-80]<sup>+</sup> = pérdida de grupo sulfato.

\*Tipo de sustituyentes. Tipo 1: sin sustituyentes; tipo 2: grupo sulfato y tipo 3: *N*-metilo.

### 4.4. ESTUDIO DE LOS COMPONENTES SUPERFICIALES DEL MUTANTE C8.-

#### 4.4.1. MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS DEL MUTANTE C8.-

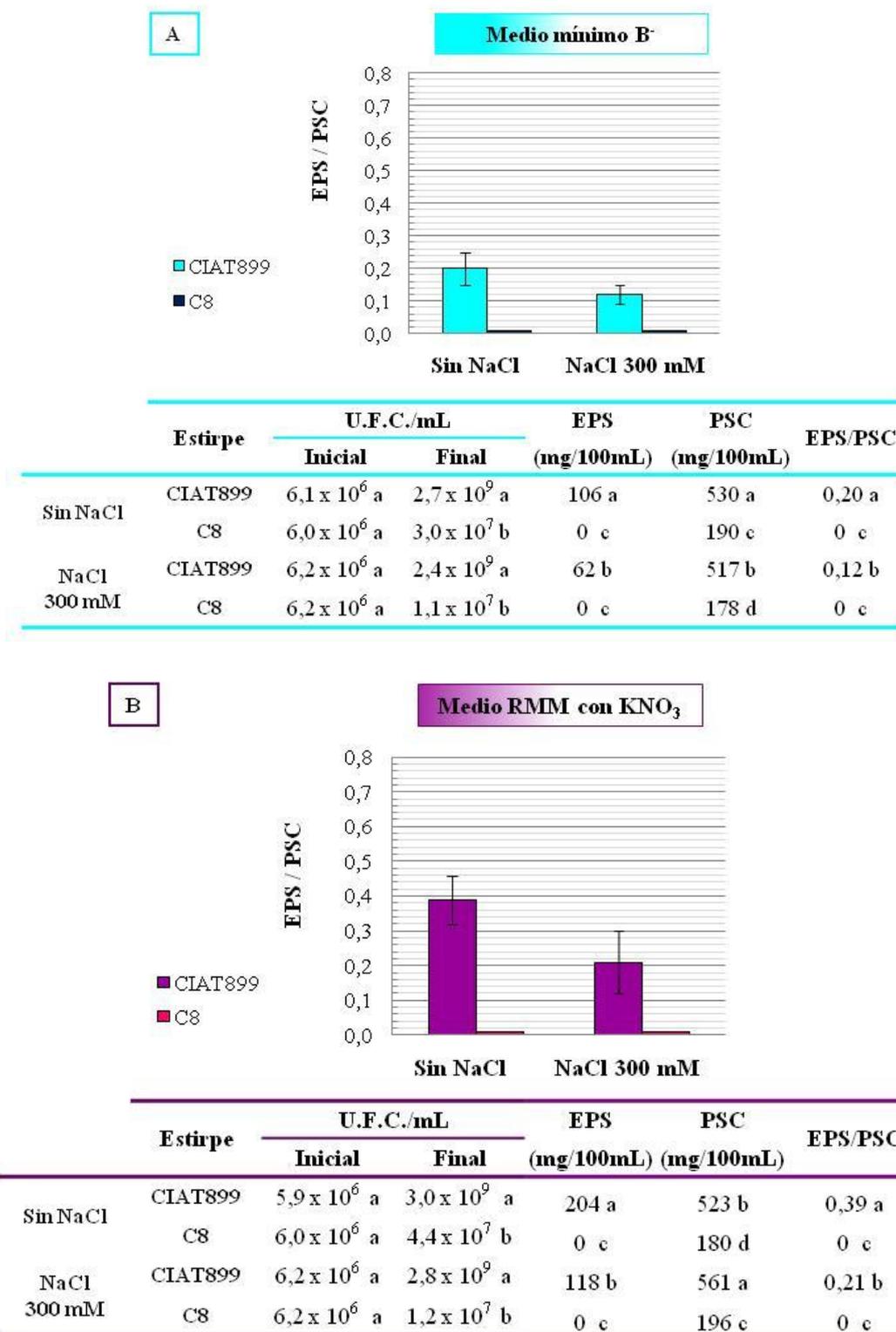
Las colonias del mutante C8 tienen aspecto similar pero menor tamaño que las de CIAT899 cuando crecen durante el mismo tiempo en los medios de cultivo usados habitualmente en nuestro laboratorio. No obstante, al crecer durante varios días en medio B<sup>-</sup> el mutante C8 desarrolla colonias de dos tamaños distintos (**Apartado 4.2.2**).

#### 4.4.2. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS.-

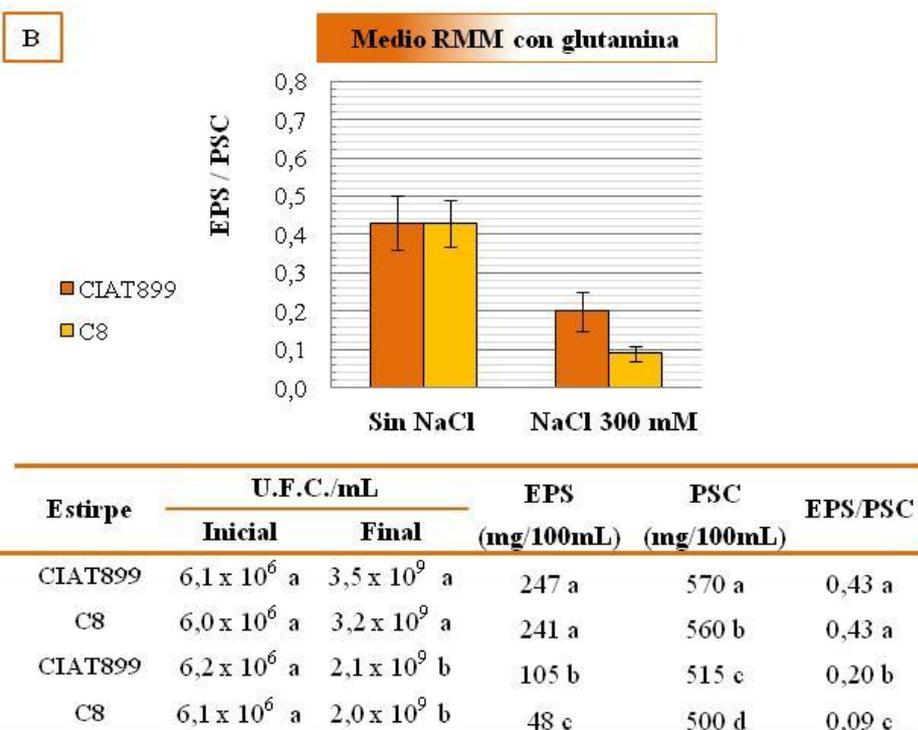
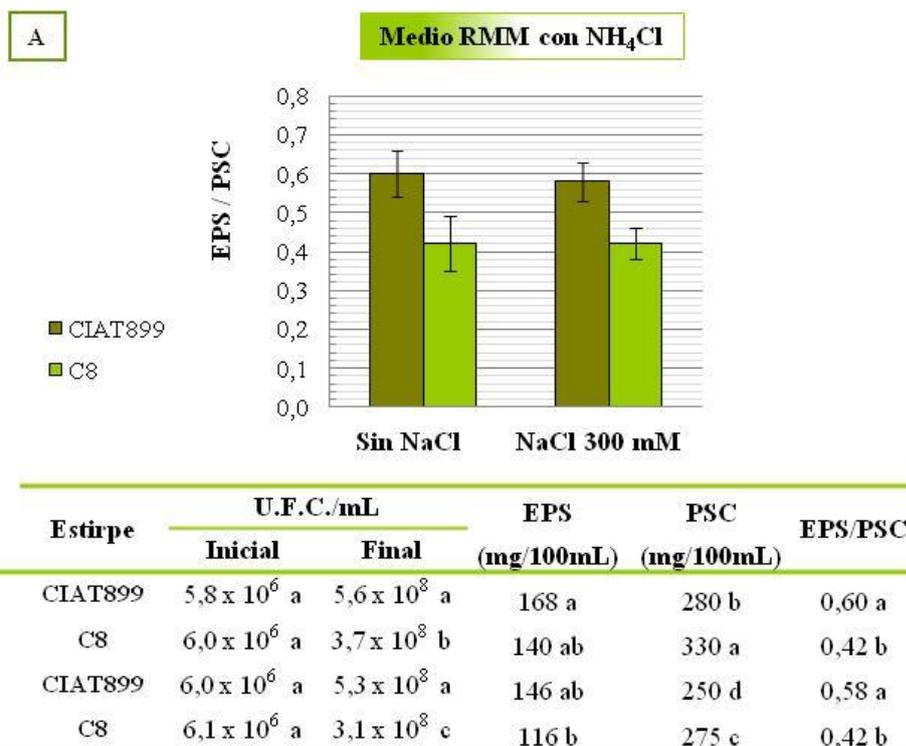
##### 4.4.2.1. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE EPS EN MEDIO LÍQUIDO.-

Se investigó si la mutación en el gen *glnD* de *R. tropici* CIAT899 afecta a la producción de exopolisacáridos (EPS) en medio B<sup>-</sup> y en medio RMM con distintas fuentes de nitrógeno (KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl y glutamina), tanto en presencia como en ausencia de NaCl 300 mM. Para ello, se cuantificó la cantidad de EPS producida por CIAT899 y C8 tras 5 días de cultivo en medio líquido en las distintas condiciones. Para facilitar la comparación de los resultados, se dividió el valor del peso seco del EPS entre el peso seco de las células totales de cada cultivo.

Como se observa en la **Figura R36**, CIAT899 produjo más EPS en medio RMM con KNO<sub>3</sub> (**panel B**) que en medio B<sup>-</sup> (**panel A**) tanto con NaCl como sin NaCl. Posiblemente este hecho sea consecuencia de la mayor relación C/N del medio RMM respecto al medio B<sup>-</sup>, que posee doble cantidad de nitratos que el medio RMM, en el que la única fuente de nitrógeno es el KNO<sub>3</sub>. Además, la producción de EPS de CIAT899 se redujo notablemente con NaCl 300 mM en ambos medios (**paneles A y B**), y el mutante C8 apenas creció y el EPS que produjo resultó inapreciable en todas las condiciones. Por otra parte, como se muestra en el **panel A** de la **Figura R36**, la cantidad de EPS producida por CIAT899 fue significativamente superior a la de C8 en medio RMM con NH<sub>4</sub>Cl, con y sin NaCl. Sin embargo, el estrés salino no afectó a la producción de EPS de ninguna de las estirpes con NH<sub>4</sub>Cl. Por último, cuando se empleó medio RMM con glutamina (**panel B** de la **Figura R36**), tanto CIAT899 como C8 produjeron una elevada cantidad de EPS sin apreciarse diferencias significativas entre ambas, y su producción se redujo significativamente con NaCl, especialmente en C8. Estos resultados indican que la mutación en *glnD* afecta a la producción de EPS en medio RMM con glutamina sólo en presencia de NaCl 300 mM.



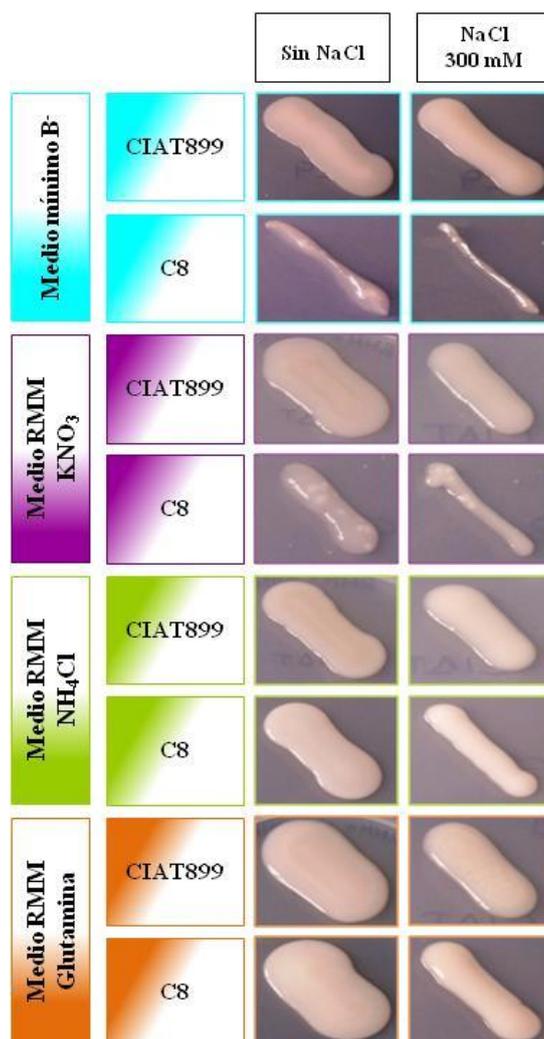
**Figura R36.-** Cuantificación del EPS producido por *R. tropici* CIAT899 y el mutante C8 en medios con nitrato como única fuente de nitrógeno en ausencia y presencia de NaCl 300 mM. **Panel A:** medio mínimo B<sup>-</sup> [KNO<sub>3</sub> + Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. **Panel B:** medio mínimo RMM con KNO<sub>3</sub>. Los datos son media de 3 repeticiones independientes. Las letras “a”, “b”, “c” y “d” dentro de cada columna identifican grupos de datos significativamente distintos al nivel del 5%. PSC: peso seco de las células totales.



**Figura R37.-** Cuantificación del EPS producido por *R. tropici* CIAT899 y el mutante C8 en medio RMM con NH<sub>4</sub>Cl (**panel A**) y con glutamina (**panel B**) como fuentes de nitrógeno en ausencia y presencia de NaCl 300 mM. Los datos son media de 3 repeticiones independientes. Las letras “a”, “b”, “c” y “d” dentro de cada columna identifican grupos de datos significativamente distintos al nivel del 5%. PSC: peso seco de las células totales.

#### 4.4.2.2. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE EPS EN MEDIO SÓLIDO.-

Igualmente se evaluó la producción de EPS observando la mucosidad producida por CIAT899 y C8 en medio sólido (**Figura R38**). Tanto CIAT899 como C8 produjeron mucho polisacárido y su aspecto fue similar en todos los medios, salvo en medio B<sup>-</sup> y medio RMM con KNO<sub>3</sub>, en los que C8 creció muy poco y se observó un cambio en la consistencia del polisacárido respecto al de CIAT899. La mucosidad de ambas bacterias fue mayor cuando se empleó glutamina como fuente de nitrógeno, y con NaCl 300 mM disminuyó en todos los casos.



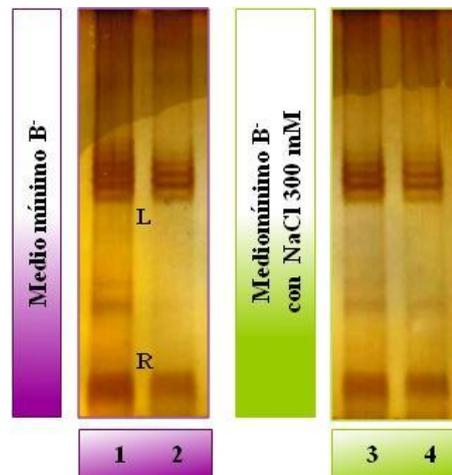
**Figura R38.-** Aspecto de la mucosidad producida por *R. tropici* CIAT899 y el mutante C8 tras 5 días de crecimiento en placas de medio B<sup>-</sup> y medio RMM con distintas fuentes de nitrógeno (KNO<sub>3</sub>, HN<sub>4</sub>Cl y glutamina). Los ensayos se realizaron con y sin NaCl 300 mM.

#### 4.4.3. ANÁLISIS DEL PERFIL DE LIPOPOLISACÁRIDOS.-

Para comprobar si la mutación en el gen *glnD* ocasiona cambios en el perfil de LPS de *R. tropici* CIAT899, se comparó el LPS extraído de cultivos de CIAT899 y del

## Resultados

mutante C8 mediante electroforesis SDS-PAGE y tinción con plata. Los ensayos se realizaron en medio B<sup>-</sup> con y sin NaCl 300 mM para determinar también los posibles efectos del estrés salino en el perfil de LPS (**Figura R39**).

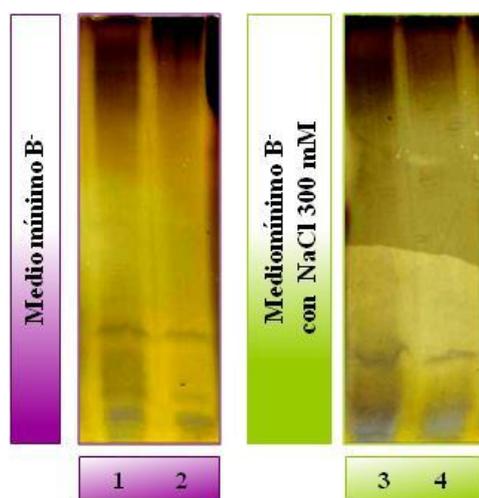


**Figura R39.-** Perfil de LPS de *R. tropici* CIAT899 (**carriles 1 y 3**) y del mutante C8 (**carriles 2 y 4**) en medio B<sup>-</sup> con y sin NaCl 300 mM. **L:** fracción de LPS liso; **R:** fracción de LPS rugoso.

Como se aprecia en la **Figura R39**, los LPS extraídos de *R. tropici* CIAT899 se agrupan en dos fracciones electroforéticamente distintas. La primera fracción comprende una serie de bandas de alto peso molecular que adquiere un patrón en escalera, que se deben corresponder con el denominado LPS liso (moléculas completas de LPS con diferente número de unidades de antígeno O unidas). La segunda fracción de LPS comprende una banda de elevada movilidad electroforética que se corresponde con el denominado LPS rugoso (lípidos A con la región central o “core”) (Carlson, 1984; Vinuesa *et al.*, 1999). El LPS extraído a partir de cultivos de CIAT899 con NaCl 300 mM (**carril 3**) originó el mismo patrón que el obtenido sin estrés (**carril 1**). El perfil de LPS del mutante C8 no presentó cambios respecto al de la estirpe silvestre en ninguna de las condiciones analizadas (**carriles 2 y 4**). Estos resultados indican que el perfil de LPS de *R. tropici* CIAT899 no se ve afectado por el estrés salino ni por la inserción de Tn5-Mob en *glnD*.

#### 4.4.4. ANÁLISIS DEL PERFIL DE POLISACÁRIDOS CAPSULARES TIPO ANTÍGENO K.-

Se analizó si la mutación en el gen *glnD* tiene algún efecto en el perfil de KPS de *R. tropici* CIAT899. Las extracciones del KPS se realizaron a partir de cultivos de CIAT899 y de C8 en medio B<sup>-</sup>, con y sin NaCl 300 mM. Los resultados obtenidos se recogen en la **Figura R40**, en la que se observa que CIAT899 y C8 mostraron el mismo perfil de KPS en las diferentes condiciones analizadas.



**Figura R40.-** Perfil de KPS de *R. tropici* CIAT899 (carriles 1 y 3) y del mutante C8 (carriles 2 y 4) en medio B<sup>-</sup> con y sin NaCl 300 mM.

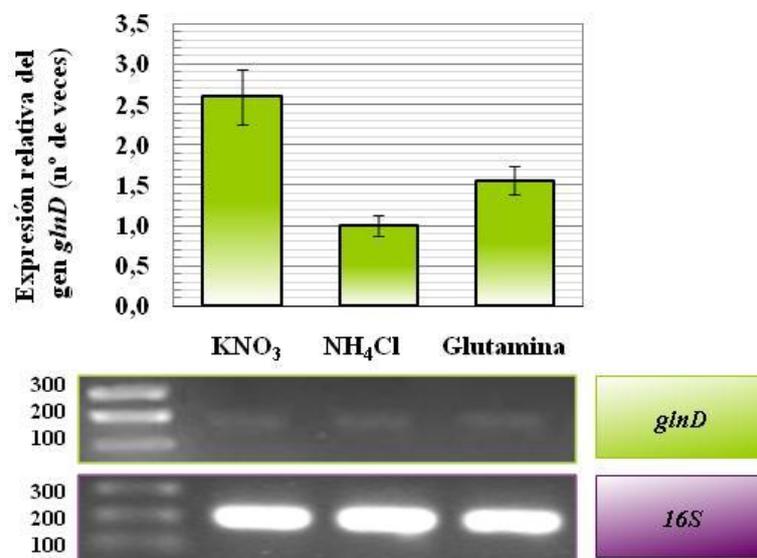
#### 4.5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *glnD*.-

Mediante experimentos de RT-PCR cuantitativa se analizó la expresión del gen *glnD* de *R. tropici* CIAT899 en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno. Para ello, se utilizó la pareja de cebadores C8TTRT-F y C8TTRT-R, y se tomó como molde el ADNc retrotranscrito a partir del ARN aislado de cultivos de CIAT899 en medio RMM con KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl y glutamina. El nivel de expresión del gen *glnD* en las distintas situaciones se cuantificó en relación a la expresión que mostró en medio RMM con NH<sub>4</sub>Cl (valor 1). Se empleó como normalizador de los datos el nivel de expresión del gen que codifica el ARNr 16S en *R. tropici* CIAT899, cuya expresión no difirió de forma significativa en las distintas condiciones analizadas. En la **Figura R41** se muestran los resultados obtenidos. Los valores de los C<sub>q</sub> obtenidos (C<sub>q</sub> ≥ 38) indicaron que *glnD* se transcribe a bajos niveles en CIAT899 independientemente de la fuente de nitrógeno empleada. Las cuantificaciones realizadas nos indicaron que, con NH<sub>4</sub>Cl y con glutamina, el nivel de expresión de *glnD* es inferior al registrado al emplear KNO<sub>3</sub> como única fuente de nitrógeno en el medio.

Además, para determinar la existencia de alguna relación entre el patrón de expresión del gen *glnD* y el de los genes *nod*, se analizó, también mediante RT-PCR cuantitativa, la expresión de *glnD* en CIAT899 en las condiciones que inducen la expresión de los genes *nod*. Se utilizó la pareja de cebadores C8TTRT-F y C8TTRT-R y como molde en la reacción se empleó ADNc retrotranscrito a partir del ARN aislado de cultivos de CIAT899 en medio B<sup>-</sup>, medio B<sup>-</sup> con apigenina, medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM

## Resultados

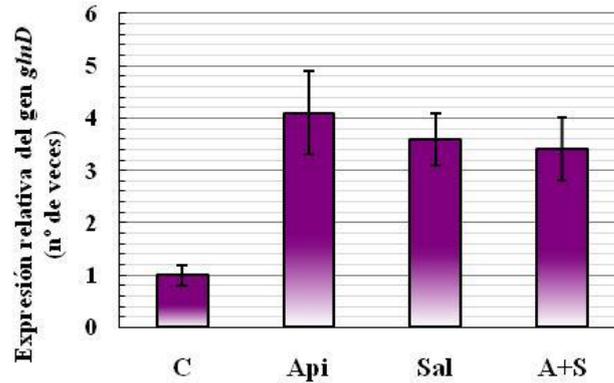
y medio B<sup>-</sup> con apigenina y NaCl 300 mM. Se realizó una cuantificación relativa del nivel de expresión del gen *glnD* frente a la expresión registrada en ausencia de inductores (valor 1), empleando como normalizador de los datos el nivel de expresión del gen que codifica el ARNr 16S de *R. tropici* CIAT899, cuya expresión no difirió en las distintas condiciones. Como se puede apreciar en la **Figura R42**, el gen *glnD* de CIAT899 se expresó hasta 4 veces más en medio B<sup>-</sup> con apigenina (**Api**), con NaCl 300 mM (**Sal**) y con ambos inductores de los genes *nod* a la vez (**A+S**) que en ausencia de inductores (**C**). Además, su nivel de expresión no difirió significativamente en estas tres condiciones mencionadas.



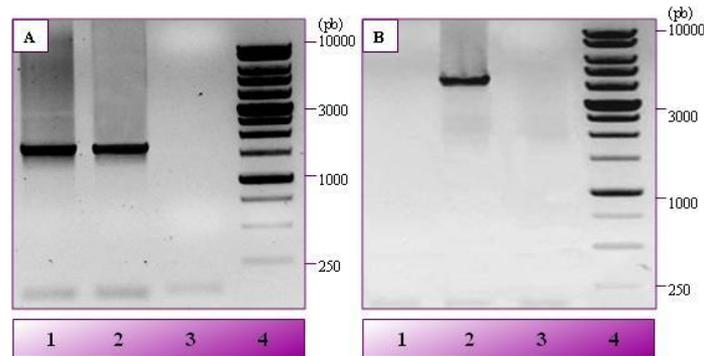
**Figura R41.-** Análisis por RT-PCR cuantitativa del ARNm extraído de *R. tropici* CIAT899 en medio RMM con KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl y glutamina. Se utilizaron los cebadores C8TTRT-F y C8TTRT-R para amplificar un fragmento interno del gen *glnD* de ~ 170 pb. El gen que codifica el ARNr 16S se usó como referencia. Se muestran los valores relativos a la expresión de *glnD* en *R. tropici* CIAT899 con NH<sub>4</sub>Cl (valor 1). Las medidas fueron realizadas por triplicado. Las barras indican las desviaciones estándar. Los tamaños de los marcadores de peso molecular (pb) se indican a la izquierda de la fotografía.

### 4.6. ESTUDIO DE LA MOVILIDAD DEL MUTANTE C8. EL GEN *mviN*.-

Se comprobó la proximidad física de *glnD* y *mviN* mediante PCR empleando las parejas de cebadores MviN5-MviN3 y GlnD5-MviN3. En la **Figura R43** se observa que el gen *mviN* se amplificó tanto en CIAT899 como en C8 (**panel A**), en tanto que, posiblemente debido a la inserción del transposón Tn5-Mob en *glnD* en C8, la amplificación conjunta de ambos genes sólo fue posible en la estirpe silvestre (**panel B**).



**Figura R42.-** Cuantificación relativa de la expresión del gen *glnD* de *R. tropici* CIAT899 en medio B<sup>-</sup> (C), medio B<sup>-</sup> con apigenina (1µg/mL) (Api), medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM (Sal) y medio B<sup>-</sup> con apigenina y NaCl 300 mM (A+S). Se muestran los valores relativos a la expresión obtenida en ausencia de inductores de los genes *nod* (C, valor 1). Las medidas se realizaron por triplicado en dos experimentos independientes. Las barras verticales indican las desviaciones estándar.

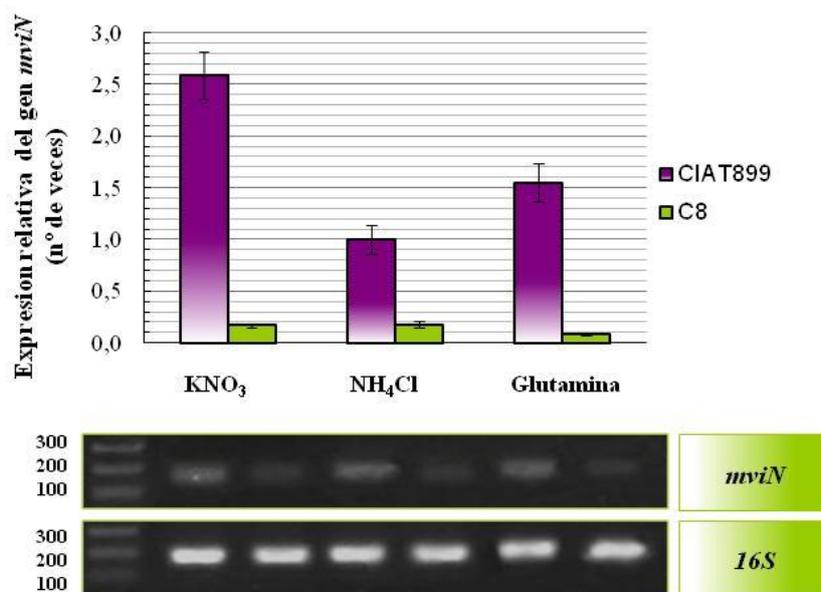


**Figura R43.-** Amplificación por PCR de un fragmento de ~ 1600 pb del gen *mviN* (panel A) y de un fragmento de ~ 4500 pb que contiene a los genes *glnD* y *mviN* (panel B) de *R. tropici* CIAT899 utilizando las parejas de cebadores MviN5-MviN3 y GlnD5-MviN3, respectivamente. **Carriles 1.-** ADN genómico del mutante C8, **carriles 2.-** ADN genómico de CIAT899, **carriles 3.-** control sin ADN y **carriles 4.-** marcador de 1 kb. Los tamaños del marcador (pb) se muestran a la derecha de las figuras.

Apenas hay estudios sobre la función de MviN en *R. tropici*. O'Connell *et al.* (1998) demostraron que el gen *mviN* no es necesario en *R. tropici* CIAT899 para la fijación simbiótica de nitrógeno, pero sugieren su requerimiento para la movilidad de esta bacteria. Para determinar si la mutación en *glnD* afecta a la expresión de *mviN* en *R. tropici* CIAT899, realizamos experimentos de RT-PCR cuantitativa con la pareja de cebadores MviNRT-F y MviNRT-R. De esta forma se amplificó un fragmento interno de ~ 190 pb del gen *mviN* (Figura R44), usando como molde ADNc retrotranscrito a partir del ARN extraído de cultivos de CIAT899 y de C8 en medio RMM con KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl y glutamina. El nivel de expresión del gen *mviN* se cuantificó en relación a la

## Resultados

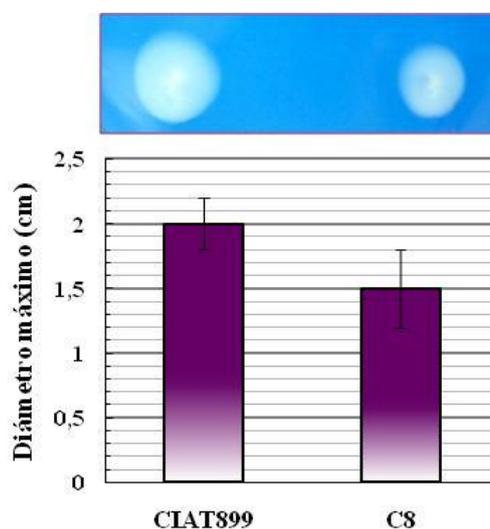
expresión que mostró en CIAT899 con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (valor 1), y empleando como gen de referencia el que codifica el ARNr 16S en CIAT899, cuya expresión no difiere de forma significativa en las distintas condiciones analizadas. El nivel de expresión del gen *mviN* en CIAT899 varía en función de la fuente de nitrógeno empleada en el crecimiento de la bacteria y, en general, se expresa a bajos niveles en todas las condiciones analizadas, puesto que, en todos los casos, se obtuvieron valores de  $C_q \geq 38$  ciclos. Con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y glutamina el nivel de expresión de *mviN* fue inferior al obtenido con  $\text{KNO}_3$ . Con independencia de la fuente de nitrógeno empleada, el nivel de transcripción del gen *mviN* en el mutante C8 fue significativamente inferior al obtenido en CIAT899 en las diferentes condiciones. Estos resultados indican que la inserción del transposón Tn5-Mob en la segunda mitad del gen *glnD* de *R. tropici* CIAT899 afecta de forma polar a la transcripción del gen contiguo *mviN*.



**Figura R44.-** Análisis por RT-PCR cuantitativa del ARNm extraído de *R. tropici* CIAT899 y del mutante C8 en medio RMM con  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y glutamina. Se utilizaron los cebadores MviNRT-F y MviNRT-R para amplificar un fragmento interno de ~ 190 pb del gen *mviN*. El gen que codifica el ARNr 16S se usó como referencia. Se muestran los valores relativos a la expresión de *mviN* en *R. tropici* CIAT899 con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (valor 1). Las medidas se realizaron por triplicado. Las barras verticales indican las desviaciones estándar. Los tamaños de los marcadores de peso molecular (pb) se indican a la izquierda de la fotografía.

Ya que la expresión del gen *mviN* estaba afectada en el mutante C8, se analizó el efecto de la mutación del gen *glnD* en la movilidad tipo “swimming” de *R. tropici* CIAT899. Para evitar interferencias debidas al crecimiento, las bacterias se cultivaron

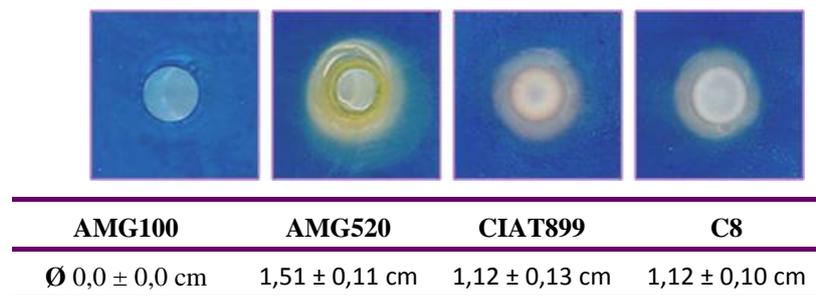
en medio RMM con glutamina hasta fase exponencial tardía. Se inocularon 3  $\mu$ L en placas de medio YM diluído 1/10 y con agar al 0,3% (m/v), en las que se observó la formación de los halos de movilidad. Como se muestra en la **Figura R45**, el diámetro del halo formado por C8 fue significativamente inferior al desarrollado por CIAT899. Es decir, el mutante C8 es menos móvil que CIAT899.



**Figura R45.-** Efecto de la mutación del gen *glnD* en la movilidad de *R. tropici* CIAT899. Las bacterias se cultivaron en medio RMM con glutamina. Se indica la medida media del diámetro del halo de movilidad máximo alcanzado por cada estirpe en tres experimentos independientes. Las barras verticales indican las desviaciones estándar.

#### 4.7. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS POR EL MUTANTE C8.-

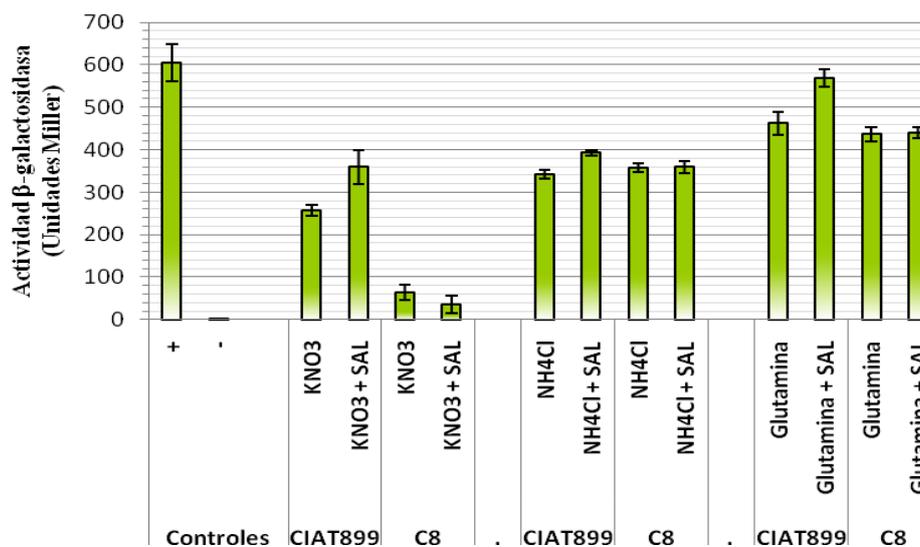
En función del organismo del que se trate, la mutación en el gen *glnD* puede tener efectos polares en otros genes esenciales y originar así muy diversos fenotipos. El mutante en *glnD* de *Vibrio fischeri* obtenido por Graft & Ruby (2000), no produjo sideróforos ni creció con diferentes fuentes de nitrógeno, lo que indicó una posible relación entre los genes reguladores del metabolismo del nitrógeno y del hierro en esa bacteria. Aunque O'Connell *et al.* (1998) encontraron indicios, no lograron demostrar una relación similar en *R. tropici* CIAT899. Por ello, decidimos investigar si la expresión de *glnD* guarda relación con la producción de sideróforos en CIAT899. Se comparó la capacidad de producir sideróforos de CIAT899 y de C8 en medio B<sup>-</sup> libre de hierro. Como se muestra en la **Figura R46**, no hubo diferencias significativas en la producción de sideróforos de CIAT899 y del mutante C8, lo que indica que la mutación de *glnD* no afecta a la producción de sideróforos en *R. tropici* CIAT899.



**Figura R46.-** Detección de la producción de sideróforos en *R. tropici* CIAT899 y en el mutante C8. Como controles positivo y negativo del ensayo se emplearon las estirpes *Pantoea* sp. AMG520 y *Klebsiella* sp. AMG100, respectivamente. Se indica la medida media del diámetro del halo detectado en tres ensayos independientes  $\pm$  la desviación estándar.

#### 4.8. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE AHL POR EL MUTANTE C8.-

Se analizó la influencia del gen *glnD* en la producción de autoinductores (AHL) de *R. tropici* CIAT899. Para ello, se analizó de forma cuantitativa la capacidad de producción de autoinductores de CIAT899 y de C8 en medio RMM con  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y glutamina. El estudio consistió en realizar un ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en la estirpe indicadora NT1[pZLR4] de *Agrobacterium tumefaciens* cultivada en 2 mL de medio YM con 500  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de los cultivos de CIAT899 y de C8 en las distintas condiciones. Como control positivo del ensayo se consideró la actividad  $\beta$ -galactosidasa de *A. tumefaciens* NT1[pZLR4] en 2 mL de YM con gentamicina y 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  con 0,015  $\mu\text{g}$  de oxo-hexanoil-homoserina lactona (OHHL). Como control negativo se consideró la actividad  $\beta$ -galactosidasa basal de *A. tumefaciens* NT1[pZLR4] en 2 mL de YM con gentamicina y 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . Como se observa en la **Figura R47**, tanto CIAT899 como C8 produjeron autoinductores en medio RMM, y la producción fue mayor con glutamina y menor con  $\text{KNO}_3$ . El mutante C8 apenas produjo autoinductores con  $\text{KNO}_3$ , lo que pudo deberse a su escaso crecimiento en este medio. Además se observó que, con independencia de la fuente de nitrógeno empleada, el  $\text{NaCl}$  300 mM estimuló la producción de autoinductores en CIAT899 pero no en el mutante C8.



**Figura R47.-** Actividad  $\beta$ -galactosidasa de *A. tumefaciens* NT1[pZLR4] crecida en YM con el sobrenadante de cultivos de *R. tropici* CIAT899 y del mutante C8 en medio RMM con KNO<sub>3</sub>, HN<sub>4</sub>Cl ó glutamina, con y sin NaCl 300mM (SAL). Control positivo (+): NT1[pZLR4] en YM con gentamicina (30  $\mu$ g/mL) y OHHL (5 $\mu$ g/mL). Control negativo (-): NT1[pZLR4] en YM con gentamicina. Las medidas de la actividad  $\beta$ -galactosidasa fueron realizadas por triplicado. Las barras verticales indican las desviaciones estándar.

#### 4.9. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES SIMBIÓTICAS DEL MUTANTE C8.-

##### 4.9.1. EFICIENCIA EN LA NODULACIÓN.-

Se estudió el efecto de la mutación en el gen *glnD* en el comportamiento simbiótico de *R. tropici* CIAT899 utilizando como hospedadores plantas de judía y de leucena. Los ensayos se realizaron en cámara de cultivo en condiciones bacteriológicamente controladas en el Centro “Las Torres-Tomejil” del Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (I.F.A.P.A), en colaboración con la Doctora Camacho. En todos los ensayos se incluyó la estirpe silvestre como referencia y un tratamiento no inoculado. Después de un mes y medio, para el caso de la judía, o de dos meses, para las plantas de leucena, se determinaron la nodulación (número y masa seca de los nódulos) y la masa seca de la parte aérea de las plantas.

En la **Tabla R12** se muestra que el número de nódulos producidos en las plantas de judía inoculadas con C8 fue significativamente inferior al producido en las plantas inoculadas con CIAT899. Sin embargo, para el resto de parámetros analizados (masa seca de los nódulos y masa seca de la parte aérea de la planta), no se observaron diferencias significativas entre CIAT899 y el mutante C8. En la **Figura R48** se puede observar el aspecto de las plantas de judía inoculadas con el mutante C8 frente a las

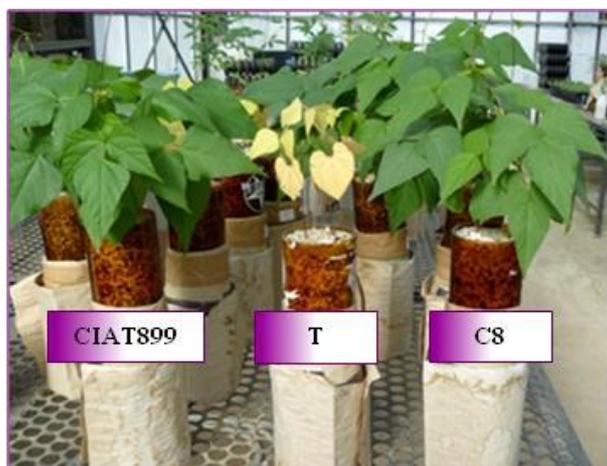
## Resultados

plantas inoculadas con CIAT899. Todas las plantas inoculadas alcanzaron un tamaño y apariencia similar y se diferenciaron claramente de las plantas testigo no inoculadas.

Por otra parte, en las plantas de leucena no se observaron diferencias significativas entre CIAT899 y el mutante C8 en ninguno de los parámetros analizados (Tabla R13). En la Figura R49 se observa que el aspecto y tamaño de las plantas inoculadas con el mutante C8 fue similar al de las inoculadas con CIAT899 y ambas se diferenciaron claramente de las plantas testigo no inoculadas.

**Tabla R12.-** Eficiencia de *R. tropici* CIAT899 y del mutante C8 en la nodulación de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa. Los datos son media de 4 repeticiones independientes. Para cada parámetro analizado las letras “a” y “b” identifican grupos de datos significativamente distintos al nivel del 5%. T: plantas control no inoculadas.

Tratamientos	Nódulos		Masa seca parte aérea (g/planta)
	Número/planta	Masa seca (mg/planta)	
CIAT899	659,2 a	0,57 a	4,05 a
C8	368,5 b	0,49 a	3,25 a
T	0	0	0,45 b



**Figura R48.-** Plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa al mes y medio de la inoculación con *R. tropici* CIAT899 y con el mutante C8. En el centro se muestra el testigo no inoculado (T).

**Tabla R13.-** Eficiencia de *R. tropici* CIAT899 y del mutante C8 en la nodulación de *L. leucocephala*. Los datos son media de 4 repeticiones independientes. Para cada parámetro analizado las letras “a” y “b” identifican grupos de datos significativamente distintos al nivel del 5%. T: plantas control no inoculadas.

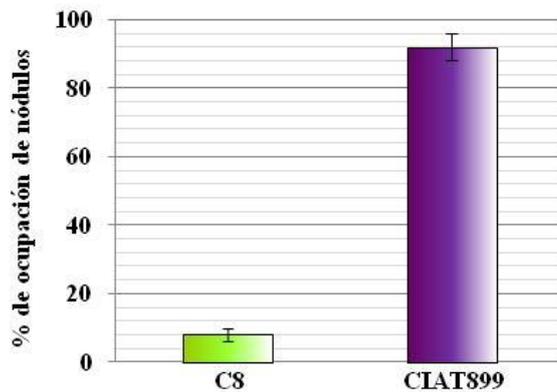
Tratamientos	Nódulos		Masa seca parte aérea (g/planta)
	Número/planta	Masa fresca (mg/planta)	
CIAT899	14,7 a	0,21 a	0,33 a
C8	13,0 a	0,18 a	0,25 a
T	0	0	0,15 b



**Figura R49.-** Plantas de *L. leucocephala* a los dos meses de la inoculación con *R. tropici* CIAT899 y con el mutante C8. A la izquierda se muestra el testigo no inoculado (T).

#### 4.9.2. COMPETITIVIDAD POR LA NODULACIÓN.-

Para determinar la influencia de la mutación en el gen *glnD* en la capacidad competitiva de *R. tropici* CIAT899, se realizaron ensayos de competitividad por la ocupación de los nódulos en plantas de judía. Los ensayos se realizaron en el Centro “Las Torres-Tomejil” del I.F.A.P.A., coinoculando CIAT899 y el mutante C8 en proporción 1:1 sobre semillas pregerminadas. Tras 30 días de cultivo, se recolectaron las plantas, se aislaron los rizobios de entre 50 y 100 nódulos, y se cultivaron en medio TY con los antibióticos adecuados para distinguir entre la estirpe silvestre (rifampicina) y la mutante (rifampicina y kanamicina). Como se observa en la **Figura R50**, CIAT899 presentó mayor capacidad competitiva que el mutante C8, ocupando el 92% de los nódulos tras la coinoculación. Estos resultados indican que la mutación de *glnD* disminuye la capacidad competitiva de *R. tropici* CIAT899 para nodular en plantas de judía.

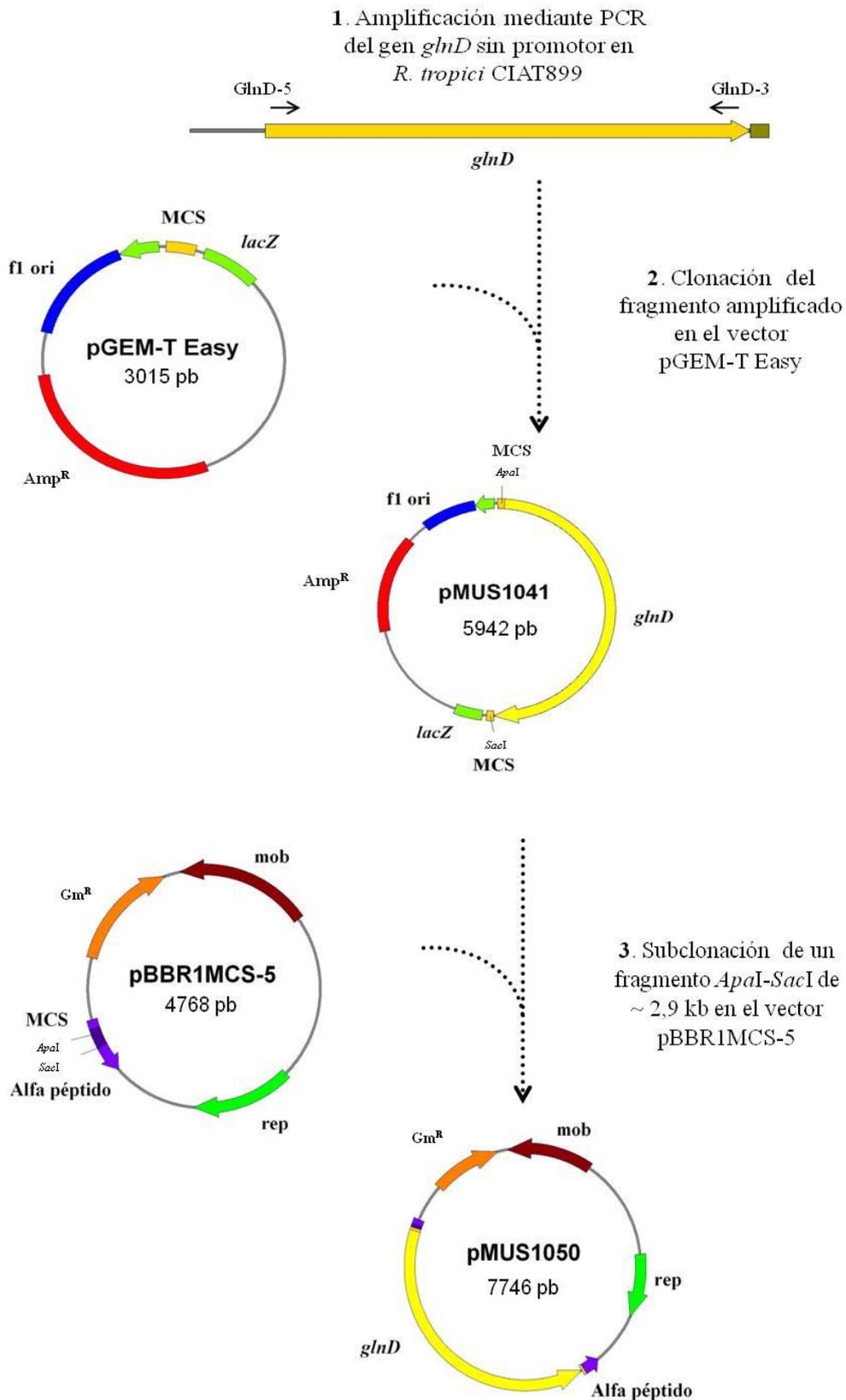


**Figura R50.-** Efecto de la mutación del gen *glnD* en la capacidad competitiva de *R. tropici* CIAT899 por la ocupación de los nódulos en *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa. Se muestran los resultados de dos ensayos independientes y el aspecto de las plantas coinoculadas con *R. tropici* CIAT899 y el mutante C8 en proporción 1:1. Las barras verticales indican las desviaciones estándar.

#### 4.10. COMPLEMENTACIÓN DE LA MUTACIÓN EN EL GEN *glnD*.-

Para complementar al mutante C8 se amplificó mediante PCR el gen *glnD* empleando los cebadores GlnD-5 y GlnD-3 situados en sus extremos. El producto de la reacción se clonó en el vector pGEM-T Easy generando así el plásmido pMUS1041. Posteriormente, se subclonó el fragmento *ApaI-SacI* de ~2,9 kb, que contenía a *glnD*, en el vector de clonación pBBR1MCS-5 cortado con las mismas enzimas. El plásmido resultante se denominó pMUS1050, en el que *glnD* quedó bajo el control del promotor del gen *lacZ* (**Figura R51**). A continuación, pMUS1050 se transfirió por conjugación triparental a CIAT899 y al mutante C8. La estirpe C8[pMUS1068] recuperó los rasgos fenotípicos de la estirpe silvestre CIAT899 en cuanto a la capacidad de crecimiento en medios con nitrato como fuente de nitrógeno (**Figura R52**), pero no la producción de factores Nod en medio B<sup>-</sup> bajo estrés salino sin flavonoides (**Figura R53**).

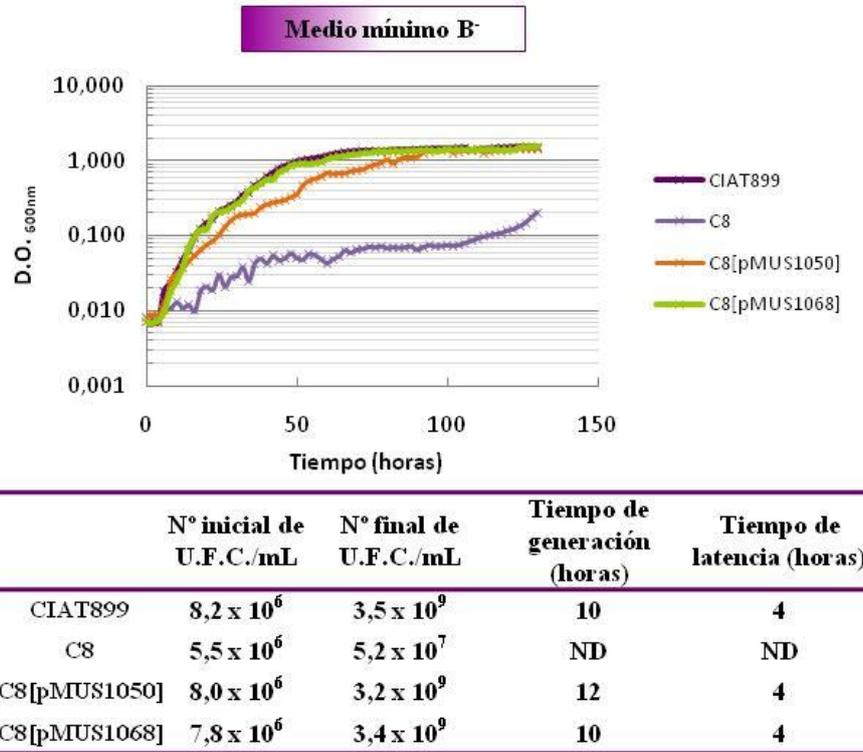
A continuación, se amplificó mediante PCR un fragmento de 3462 pb que contenía el gen *glnD*, unas 420 pb previas y unas 126 pb posteriores al gen, empleando los cebadores externos al gen GlnDext-F y GlnDext-R. El producto de la reacción se insertó en el vector de clonación pMBL (Dominion MBL), generando así el plásmido pMUS1047. Después se subclonó el fragmento *XhoI-BamHI* de ~3,5 kb, que contenía la zona amplificada, en el vector pBBR1MCS-5 cortado con las mismas enzimas.



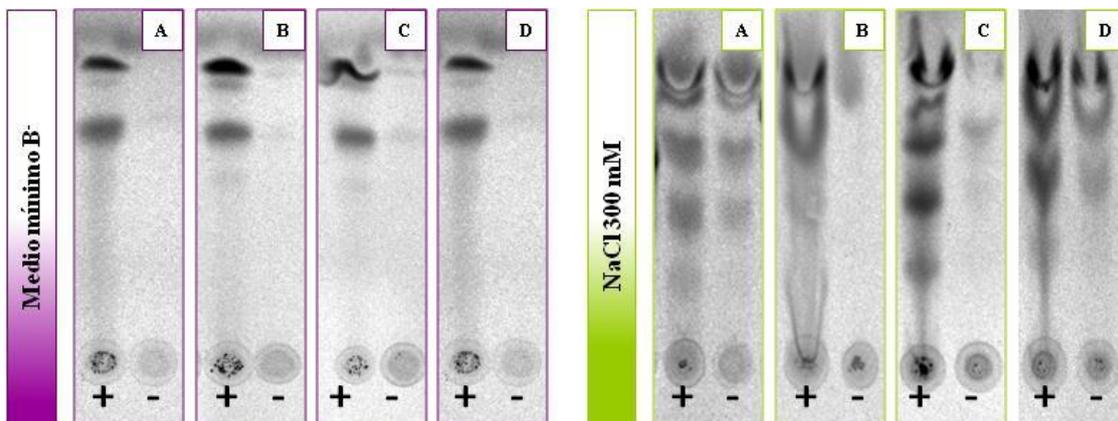
**Figura R51.-** Esquema de la construcción *in vitro* del plásmido pMUS1050 usado para complementar la mutación en el gen *glnD* de *R. tropici* CIAT899. MCS: sitio de clonación múltiple.

## Resultados

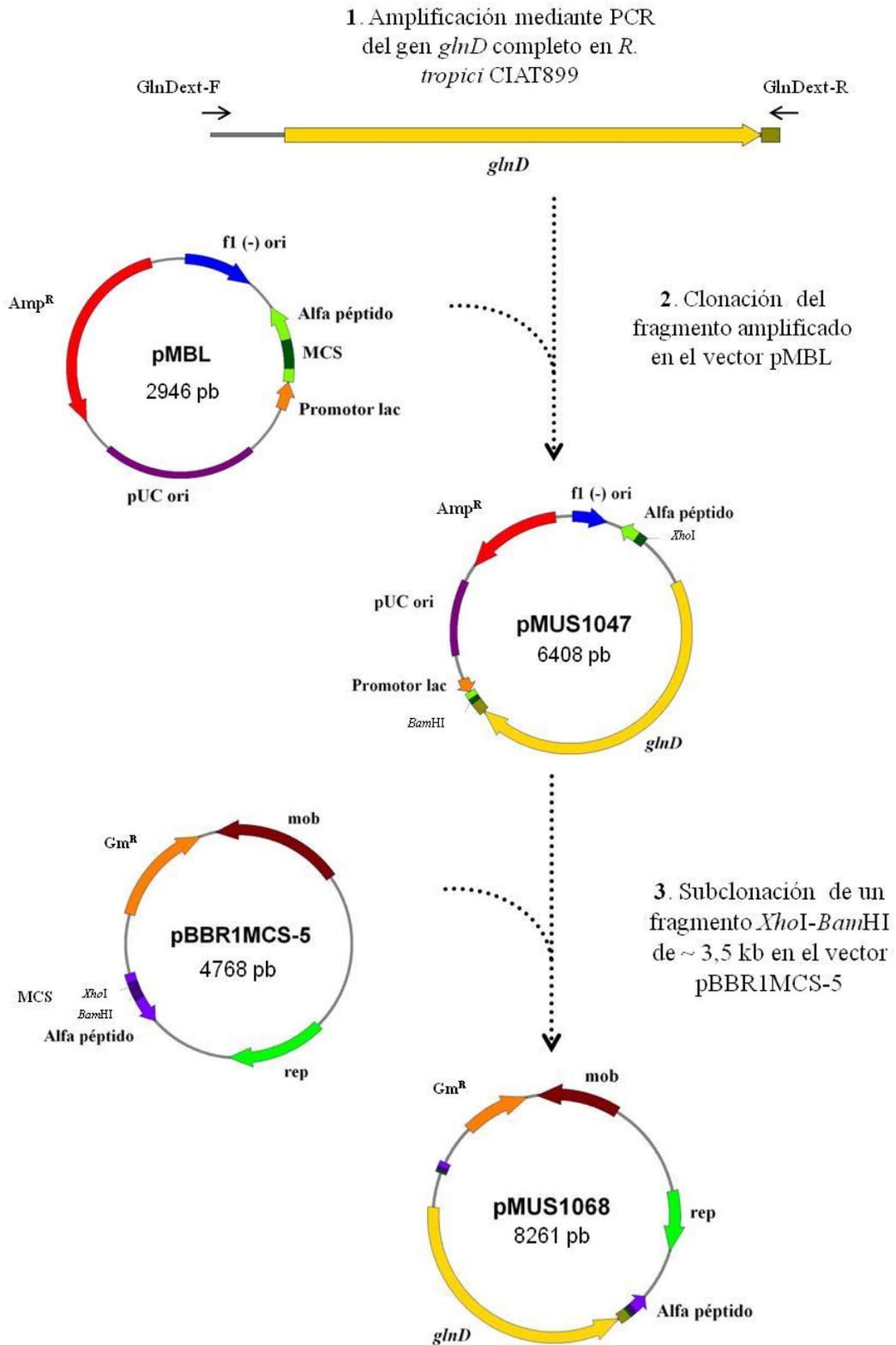
El plásmido resultante se denominó pMUS1068 (**Figura R54**), y se transfirió por conjugación triparental a CIAT899 y al mutante C8. La estirpe C8[pMUS1068] recuperó la capacidad de crecimiento en medios con nitrato (**Figura R52**) y la producción de factores Nod en medio B<sup>-</sup> con estrés salino sin flavonoides (**Figura R53**).



**Figura R52.-** Curvas y parámetros de crecimiento de *R. tropici* CIAT899, el mutante C8, C8[pMUS1050] y C8[pMUS1068] en medio B<sup>-</sup>. Los valores de D.O. a 600 nm corresponden a la media de tres repeticiones independientes. El valor de las desviaciones estándar en cada punto no fue superior a 0,07 unidades. ND: no determinado.



**Figura R53.-** Análisis mediante cromatografía en capa fina de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 (**paneles A**), el mutante C8 (**paneles B**), C8[pMUS1050] (**paneles C**) y C8[pMUS1068] (**paneles D**) en medio B<sup>-</sup> con y sin NaCl 300 mM. Los carriles con signo positivo corresponden a los cultivos inducidos con 1 µg/mL de apigenina.



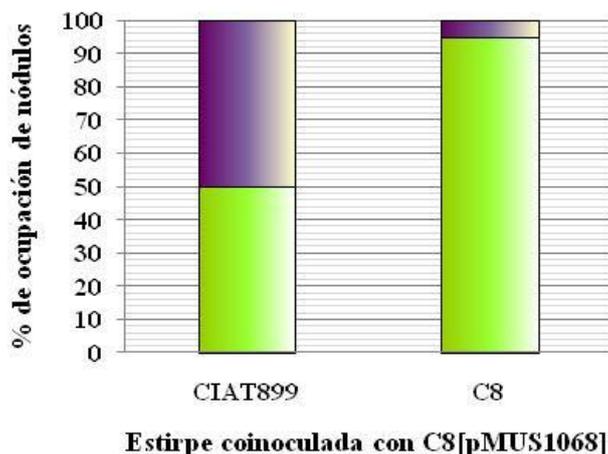
**Figura R54.-** Esquema de la construcción *in vitro* del plásmido pMUS1068 usado para complementar la mutación en el gen *glnD* de *R. tropici* CIAT899. MCS: sitio de clonación múltiple.

## Resultados

En cuanto a su fenotipo simbiótico, la estirpe C8[pMUS1068] fue igual de eficiente en la nodulación que CIAT899 (Tabla R14), y también recuperó la capacidad competitiva por la ocupación de los nódulos en plantas de judía (Figura R55). Por su parte, las estirpes CIAT899[pMUS1050] y CIAT899[pMUS1068] no mostraron ninguna alteración respecto a la estirpe silvestre en ningún rasgo fenotípico (datos no mostrados), lo que nos indicó que la presencia de dos copias del gen *glnD* en *R. tropici* CIAT899 no afecta a ninguna de las propiedades estudiadas.

**Tabla R14.-** Efectos de la complementación del gen *glnD* de *R. tropici* CIAT899 sobre la nodulación de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa. Los datos son media de 4 repeticiones independientes. Para cada parámetro analizado las letras “a” y “b” identifican grupos de datos significativamente distintos al nivel del 5%. T: plantas control no inoculadas.

Tratamientos	Nódulos		Masa seca parte aérea (g/planta)
	Número/planta	Masa seca (mg/planta)	
CIAT899	980 a	0,42 a	3,12 a
C8	531 b	0,28 a	2,13 a
C8[pMUS1068]	1037 a	0,45 a	2,95 a
T	0	0	0,45 b



**Figura R55.-** Capacidad competitiva de C8[pMUS1068] por la ocupación de los nódulos en *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa. El porcentaje de ocupación de nódulos para C8[pMUS1068] aparece en color verde, mientras que el de la estirpe coinoculada con ella aparece en color oscuro.

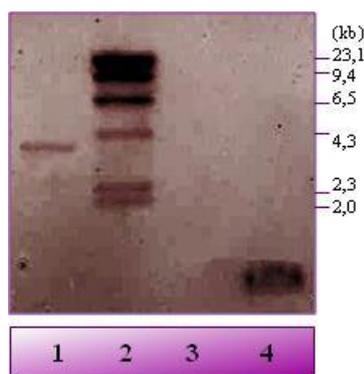
## 5. ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE C9.-

Una vez comprobado que, en ausencia del plásmido pMP240 empleado en su selección, el mutante C9 no produce factores Nod en medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM y sin apigenina (**Figura R11**), se procedió a identificar la región en la que se había insertado el transposón Tn5-Mob y a caracterizar otros rasgos fenotípicos del mutante.

### 5.1. LOCALIZACIÓN DE LA INSERCIÓN EN EL MUTANTE C9.-

#### 5.1.1. IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DEL GEN EN EL QUE SE HA INSERTADO EL TRANSPOSÓN Tn5-Mob EN EL MUTANTE C9.-

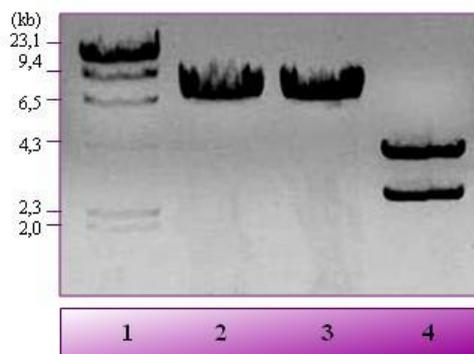
En primer lugar, se verificó la existencia de una única inserción del transposón en el genoma del mutante C9. Para ello, se realizó una hibridación digiriendo el ADN genómico del mutante C9 con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*. La sonda empleada fue homóloga a un fragmento del gen de resistencia a la kanamicina de Tn5-Mob. El resultado de la hibridación se muestra en la **Figura R56**. Sólo un fragmento de ADN de aproximadamente 4 kb de tamaño hibridó con la sonda y, en base a su tamaño y a la situación del punto *BamHI* en la secuencia del transposón, se dedujo que este fragmento contenía unas 3 kb de la secuencia de Tn5-Mob, desde la diana *BamHI* hasta su extremo incluyendo el gen de resistencia a la kanamicina, y aproximadamente 1 kb del ADN genómico de C9, comprendido desde el punto de inserción del transposón hasta el punto *EcoRI* más próximo en el genoma.



**Figura R56.-** Comprobación mediante hibridación de la inserción del transposón Tn5-Mob en el genoma del mutante C9. El ADN genómico del mutante C9 se digirió con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*. **Carril 1.-** ADN genómico del mutante C9, **carril 2.-** marcador  $\lambda$ -*HindIII* marcado con digoxigenina, **carril 3.-** control negativo sin ADN y **carril 4.-** pMUS442 digerido con la enzima *PstI* (control positivo). Los tamaños del marcador (kb) se muestran a la derecha de la figura.

## Resultados

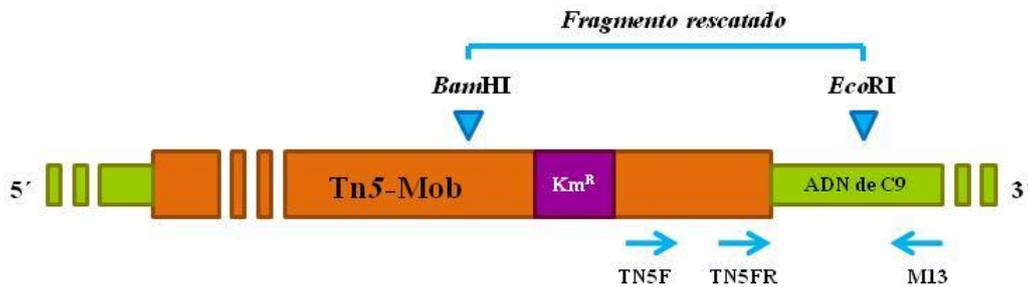
Para identificar el gen en el que se había insertado el transposón en el mutante C9 se procedió de la forma ya descrita en el **Apartado 4.1.1** para el mutante C8. Se aprovechó la única diana *Bam*HI de Tn5-Mob, situada a continuación del gen de resistencia a la kanamicina, para rescatar y secuenciar el fragmento de ADN genómico del mutante adyacente al punto de inserción. El ADN genómico del mutante C9 digerido con las enzimas *Eco*RI y *Bam*HI se ligó al vector pBlueScript cortado con las mismas enzimas. El resultado de la ligación se transfirió mediante transformación a *E. coli* DH5 $\alpha$  y los transformantes se seleccionaron en medio LB con ampicilina y kanamicina. El plásmido obtenido se denominó pMUS1031, y tuvo un tamaño de aproximadamente 7 kb (**Figura R57**).



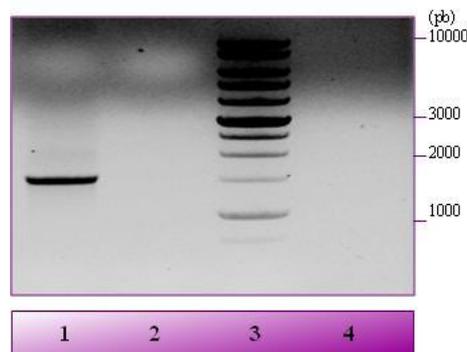
**Figura R57.-** Digestiones del plásmido pMUS1031 portador del fragmento rescatado del mutante C9. **Carril 1.-** marcador  $\lambda$ -HindIII, **carril 2.-** digestión con *Eco*RI, **carril 3.-** digestión con *Bam*HI, y **carril 4.-** digestión con *Eco*RI+*Bam*HI. Los tamaños del marcador (kb) se muestran a la izquierda de la figura.

El inserto se secuenció empleando los cebadores M13 del pBlueScript, y TN5R/TN5FR específicos del transposón (**Figura R58**). Los análisis mediante la aplicación bioinformática BLAST indicaron la ausencia de homología con los genes descritos hasta el año 2009 tanto en *Rhizobium* como en el resto de las bacterias, incluidas aquellas cuyo genoma era totalmente conocido. Sin embargo, al realizar estos mismos análisis en 2009, se obtuvo un 73% de similitud con la proteína hipotética Arad\_9143 de *Agrobacterium radiobacter* K84, cuyo número de acceso en GenBank es ACM30247 (Slater *et al.*, 2009). A continuación, para aislar y secuenciar este gen en *R. tropici* CIAT899, se diseñaron los cebadores Ara9143-F y Ara9143-R externos al gen, y se emplearon para realizar una PCR tomando como molde ADN genómico de CIAT899 y de C9. En la **Figura R59** se observa que, en CIAT899 (**carril 1**) se amplificó una única banda de aproximadamente 1,5 kb y en el mutante C9 (**carril 2**) no se obtuvo amplificación, puesto que el incremento de tamaño debido a la inserción del transposón

Tn5-Mob en dicho gen no permitió que la Taq polimerasa lo amplificara. El gen de *R. tropici* CIAT899 homólogo al gen *arad\_9143* de *A. radiobacter* K84 se registró como *bgvA* (número de acceso en GenBank HM768892).



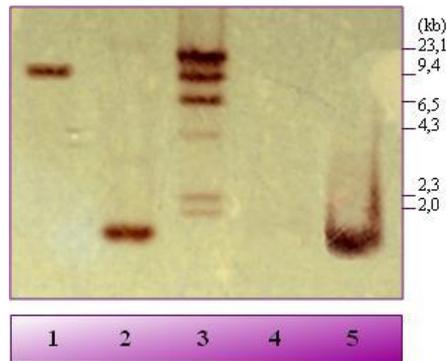
**Figura R58.-** Esquema de la región de ADN del mutante C9 en la que se insertó el transposón Tn5-Mob. Con triángulos de color azul se indican los puntos *EcoRI* y *BamHI* empleados en la estrategia de rescate de la mutación. Con flechas se indica la posición de los cebadores usados para la amplificación y secuenciación del inserto clonado en el plásmido pMUS1031 (M13, TN5FR y TN5F).



**Figura R59.-** Amplificación por PCR del gen *bgvA* de *R. tropici* CIAT899 utilizando los cebadores Ara9143-F y Ara9143-R y empleando como molde ADN genómico de *R. tropici* CIAT899 y del mutante C9. **Carril 1.-** *R. tropici* CIAT899, **carril 2.-** mutante C9, **carril 3.-** marcador de 1 kb y **carril 4.-** control negativo sin ADN. Los tamaños del marcador (pb) se muestran a la derecha de la figura.

Posteriormente, la inserción en el gen *bgvA* del mutante C9 se recomprobó mediante hibridación, digiriendo el ADN genómico de CIAT899 y del mutante C9 con la enzima *EcoRI*, empleando como sonda de hibridación el producto de PCR de ~ 1,5 kb amplificado con los cebadores Ara9143-F y Ara9143-R, e incorporando nucleótidos marcados con digoxigenina en la reacción. En la **Figura R60** se observa que la endonucleasa *EcoRI* generó un fragmento de ADN en CIAT899 que hibridó con la sonda a la altura de las ~ 1600 pb, mientras que en el mutante C9 la banda hibridada tuvo mayor tamaño, aproximadamente ~ 9 kb, debido a la inserción del transposón en el gen *bgvA*.

## Resultados



**Figura R60.-** Comprobación mediante hibridación de la inserción del transposón Tn5-Mob en el gen *bgvA* en el mutante C9. El ADN fue digerido con la enzima *EcoRI*. **Carril 1.-** ADN genómico del mutante C9, **carril 2.-** ADN genómico de *R. tropici* CIAT899, **carril 3.-** marcador  $\lambda$ -*HindIII* marcado con digoxigenina, **carril 4.-** control negativo sin ADN y **carril 5.-** sonda de hibridación Ara9143-F – Ara9143-R diluída 1/10 (control positivo). Los tamaños del marcador (kb) se muestran a la derecha de la figura.

### 5.1.2. ORGANIZACIÓN GÉNICA DE LA REGIÓN EN LA QUE SE LOCALIZA LA INSERCIÓN.-

La organización génica de la región en la que se encuentra el gen *bgvA* en *R. tropici* CIAT899 es claramente similar a la de *A. radiobacter* K84, y se caracteriza por contener mayoritariamente genes implicados en la biosíntesis y transporte de polisacáridos superficiales bacterianos. El gen *bgvA* de *R. tropici* CIAT899 es el último de un conjunto de 4 genes cuya transcripción tiene lugar en el mismo sentido, y que posiblemente constituyen un operón. Los genes anteriores y posteriores a estos 4 genes se transcriben en sentido inverso a ellos, exceptuando el segundo gen posterior al gen *bgvA*, homólogo al gen *arad\_9146* de *A. radiobacter* K84, que se transcribe en su mismo sentido (**Figura R61**).



**Figura R61.-** Esquema a escala de la organización génica de la región de ADN de *R. tropici* CIAT899 en la que se localiza el gen *bgvA*. Todos los genes son homólogos a los correspondientes en *A. radiobacter* K84. Las flechas indican el sentido de la transcripción. Se indica el sitio en el que se insertó el transposón Tn5-Mob en el mutante C9 (base 162 del gen *bgvA*).

### 5.2. ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DEL MUTANTE C9.-

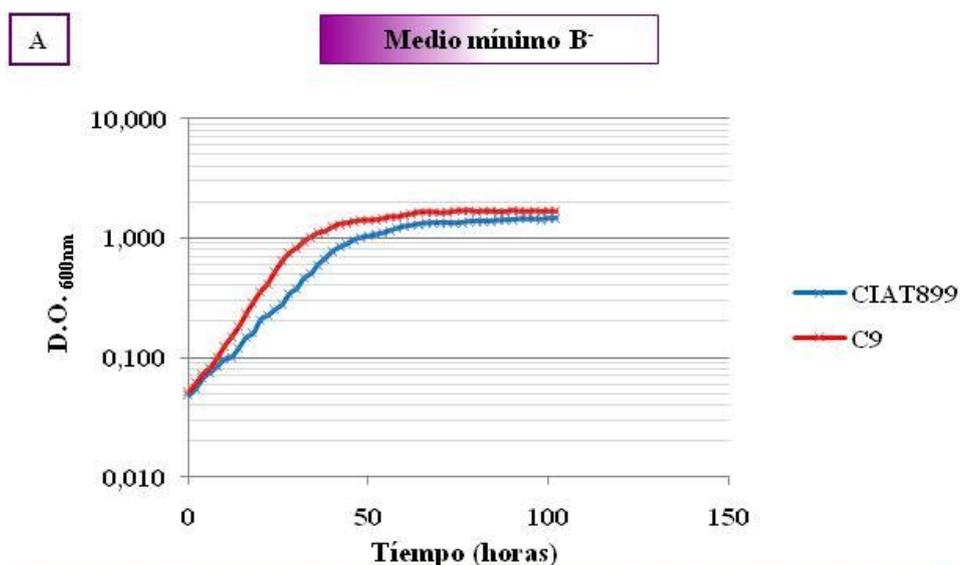
Se analizó el efecto de la mutación en el gen *bgvA* sobre el crecimiento de *R. tropici* CIAT899 en medio B<sup>-</sup>, medio B<sup>-</sup> con apigenina y medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM (**Figura R62**). En el **panel A** se observa que el mutante C9 creció en medio B<sup>-</sup> a mayor

velocidad que CIAT899, con un tiempo de generación de 8 horas frente a las 10 horas de la estirpe silvestre. En el **panel B** se aprecia que en medio B<sup>-</sup> con apigenina la situación es similar, pues el mutante C9 creció más rápido que CIAT899. Sin embargo, se observa un aumento en los tiempos de generación con respecto al crecimiento en medio B<sup>-</sup>, y hubo una mayor diferencia entre los tiempos de generación de ambas estirpes, que fueron 11 horas para C9 y 20 horas para CIAT899. Por último, en el **panel C**, se observa que con NaCl 300 mM ambas bacterias crecieron más lentamente que sin NaCl, pero el mutante C9 fue más rápido (tiempo de generación de 11 horas) que CIAT899 (tiempo de generación de 24 horas) también en estas condiciones.

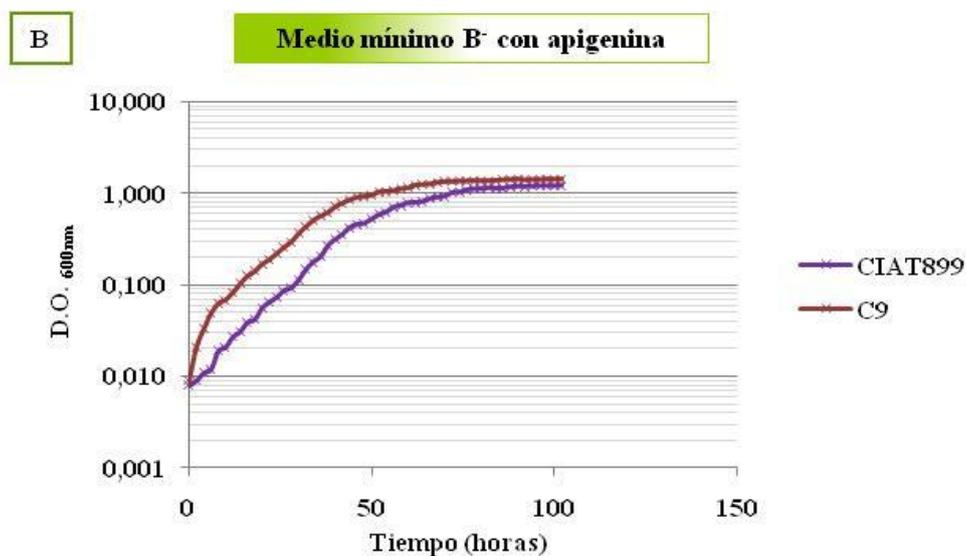
Analizando el crecimiento de cada bacteria por separado, se observa que CIAT899 crece más lentamente con apigenina (tiempo de generación de 20 horas, **panel B**) que en la condición control (tiempo de generación de 10 horas, **panel A**), y más lentamente con estrés salino (tiempo de generación de 24 horas, **panel C**) que con apigenina. Por su parte, el mutante C9 crece con el mismo tiempo de generación (11 horas) con apigenina y con NaCl (**paneles B y C**, respectivamente), y con un tiempo de generación de 8 horas en B<sup>-</sup> sin inductores (**panel A**). Además, las curvas de crecimiento del mutante C9 con apigenina y con NaCl coinciden con el crecimiento de CIAT899 en las condiciones control. Como se aprecia en las tablas inferiores a las curvas de la **Figura R62**, el número de células viables aumentó de forma similar en CIAT899 y C9 en las tres condiciones de crecimiento analizadas.

### 5.3. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS FACTORES NOD PRODUCIDOS POR EL MUTANTE C9.-

Se analizó la estructura de los factores producidos por C9 mediante técnicas de HPLC-MS/MS. En la **Figura R63** se muestran los cromatogramas obtenidos. En consonancia con los resultados obtenidos en los análisis por cromatografía en capa fina (**Apartado 3.2**), los análisis realizados confirmaron que el mutante C9 no produce factores Nod en medio B<sup>-</sup> ni en medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM. Sólo se detectó producción de factores Nod cuando C9 creció con apigenina, ya fuera con o sin NaCl. Además, como se observa en la **Figura R63** el área de los picos observados en la zona de los cromatogramas correspondiente a los factores Nod (entre los 15 y 18 minutos) fue similar en las dos condiciones analizadas. Los factores Nod identificados en estas condiciones se muestran en las **Tablas R15 y R16**.

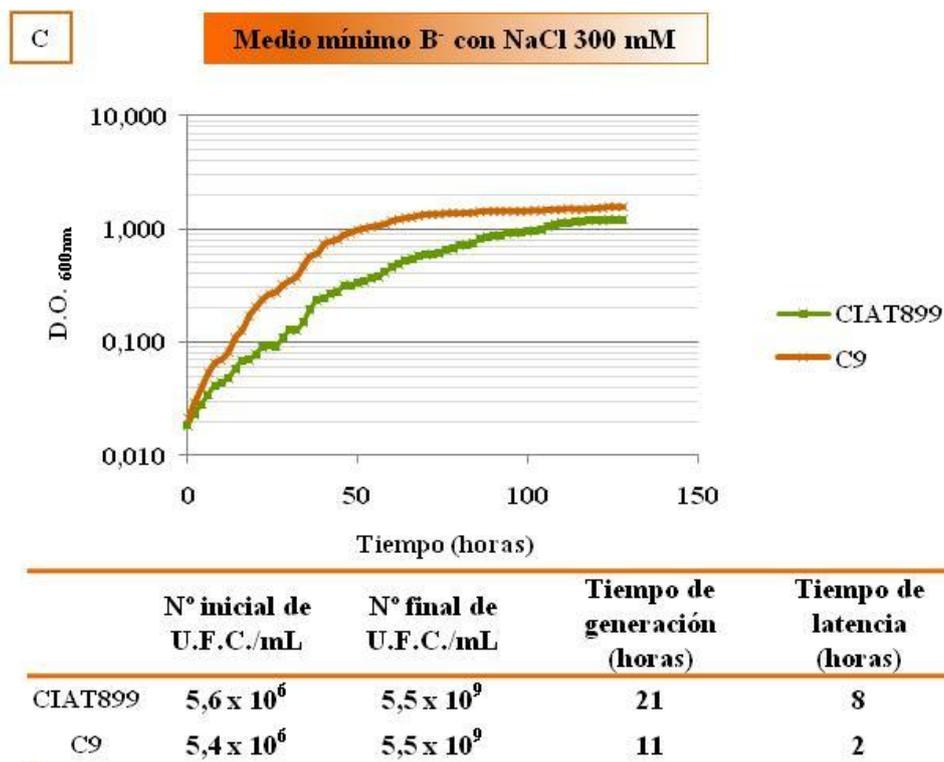


	N° inicial de U.F.C./mL	N° final de U.F.C./mL	Tiempo de generación (horas)	Tiempo de latencia (horas)
CIAT899	$6,5 \times 10^6$	$6,1 \times 10^9$	10	4
C9	$6,5 \times 10^6$	$6,5 \times 10^9$	8	2



	N° inicial de U.F.C./mL	N° final de U.F.C./mL	Tiempo de generación (horas)	Tiempo de latencia (horas)
CIAT899	$6,4 \times 10^6$	$5,6 \times 10^9$	18	4
C9	$6,2 \times 10^6$	$5,8 \times 10^9$	11	2

**Figura R62.-** Curvas de crecimiento de *R. tropici* CIAT899 y del mutante C9 en medio B<sup>-</sup> (**panel A**), medio B<sup>-</sup> con apigenina (1 µg/mL) (**panel B**) y medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM (**panel C**). Los valores de D.O. a 600nm corresponden a la media de tres repeticiones independientes. El valor de la desviación estándar en cada punto no fue superior a 0,05 unidades.

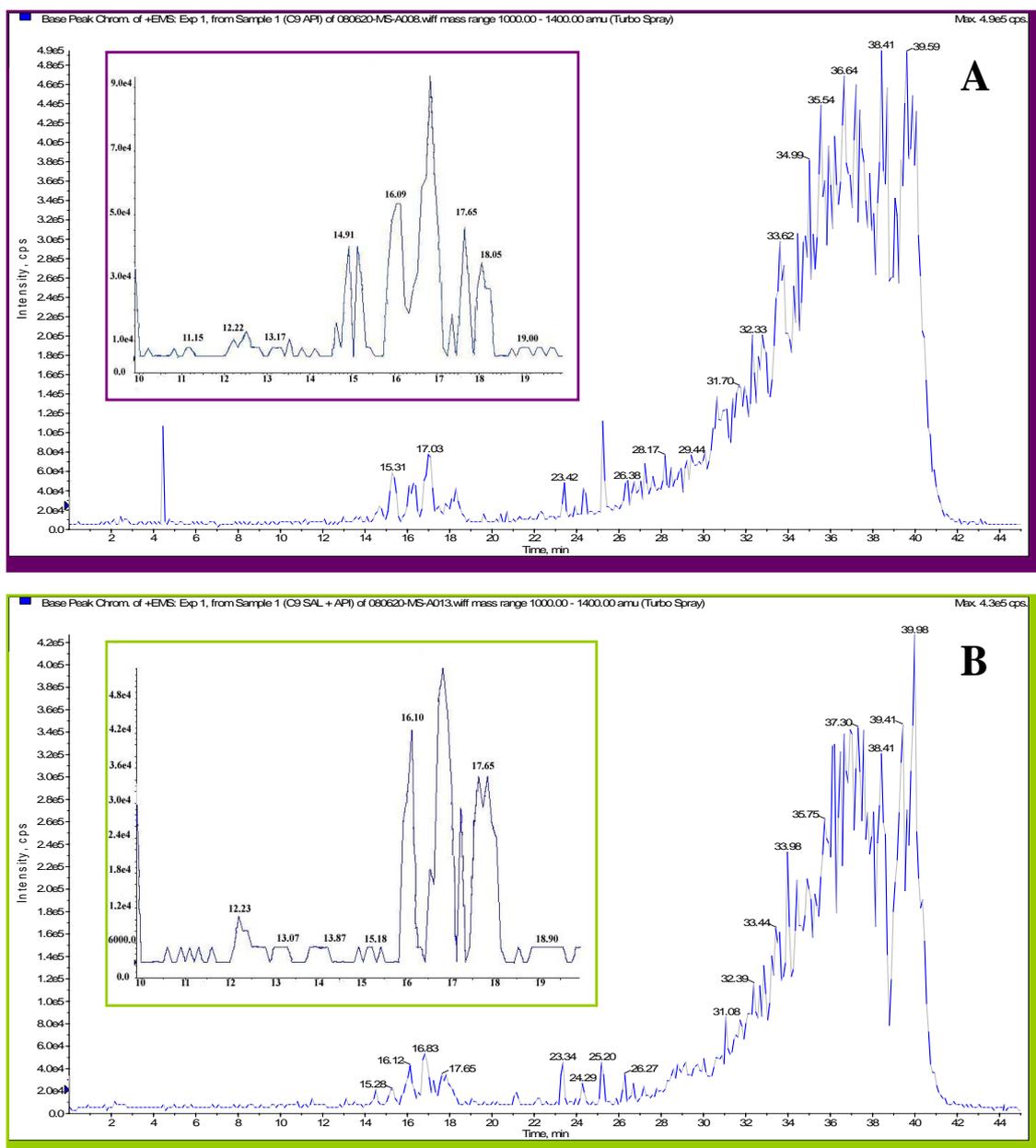


**Continuación figura R62.-** Curvas de crecimiento de *R. tropici* CIAT899 y del mutante C9 en medio B<sup>-</sup> (**panel A**), medio B<sup>-</sup> con apigenina (1 µg/mL) (**panel B**) y medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM (**panel C**). Los valores de D.O. a 600nm corresponden a la media de tres repeticiones independientes. El valor de la desviación estándar en cada punto no fue superior a 0,05 unidades.

Como se observa en la **Tabla R15**, se identificaron 9 factores Nod producidos por C9 con apigenina en ausencia de estrés salino. Todos fueron tetrámeros y pentámeros de GlcNAc con un residuo de ácido graso, saturado o no, de 16 ó 18 carbonos en el extremo no reductor. Sólo se identificaron 3 factores carentes de sustituyentes (tipo 1). El grupo *N*-metilo fue el residuo más común sobre el terminal no reductor (tipo 3), y el grupo sulfato apareció como sustituyente en el extremo reductor de uno de los factores identificados (tipo 2). Los factores Nod IV (C<sub>16:0</sub>), IV (C<sub>18:1</sub>) y IV (C<sub>18:1</sub>, NMe) fueron exclusivos del mutante C9 en esta condición.

Como se observa en la **Tabla R16**, se identificaron 7 factores Nod producidos por C9 con NaCl 300 mM y apigenina, todos pentámeros de GlcNAc comunes a los identificados en ausencia de estrés excepto el factor V (C<sub>16:0</sub>), que sólo se identificó en las fracciones de los cultivos crecidos con estrés.

## Resultados



**Figura R63.-** Cromatogramas de HPLC-MS/MS de los factores Nod producidos por el mutante C9 en medio B<sup>-</sup> con apigenina (1 µg/mL) (**panel A**) y medio B<sup>-</sup> con apigenina y NaCl 300 mM (**panel B**). En los recuadros se muestran las zonas correspondientes a los factores Nod. Eje de abscisas: tiempo (minutos) y eje de ordenadas: intensidad (cps).

**Tabla R15.-** Análisis estructural de los factores Nod producidos por el mutante C9 en medio B<sup>-</sup> con apigenina (1 µg/mL).

Estructura	Tipo*	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Iones B <sub>n</sub>
IV (C <sub>16:0</sub> )	1	1027	400, 603
IV (C <sub>18:1</sub> )	1	1053	426, 629, 832
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3	1067	440, 643, 846
V (C <sub>16:0</sub> , NMe, dNAC)	3,8	1202	414, 617, 820, 981

Tabla R15.- Continuación

Estructura	Tipo*	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Iones B <sub>n</sub>
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, dNAC)	3,8	1228	440, 643, 1007
V (C <sub>16:0</sub> , NMe)	3	1244	414, 617, 820, 1023
V (C <sub>18:1</sub> )	1	1256	426, 629, 832, 1035
V (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3	1270	440, 643, 846, 1049
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	2,3	1350	440, -, 846, 1049

Con números romanos se indica el número de unidades de GlcNAc que componen el esqueleto de los factores Nod. Entre paréntesis se indica la longitud y grado de insaturación del ácido graso y, en su caso, los distintos sustituyentes que presentan ordenados en sentido horario desde la posición del ácido graso (Spaink, 1992). NMe: *N*-metilo, S: sulfato, dNAC: sin *N*-acetilo.

\*Tipo de sustituyentes. Tipo 1: sin sustituyentes; tipo 2: grupo sulfato; tipo 3: *N*-metilo y tipo 8: sin *N*-acetilo en alguna glucosamina del esqueleto.

Tabla R16.- Análisis estructural de los factores Nod producidos por el mutante C9 en medio B<sup>-</sup> con apigenina (1 µg/mL) y NaCl 300 mM.

Estructura	Tipo*	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Iones B <sub>n</sub>
V (C <sub>16:0</sub> , NMe, dNAC)	3,8	1202	414, 617, 820, 981
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, dNAC)	3,8	1228	440, -, 846, 1007
V (C <sub>16:0</sub> )	1	1230	400, 603, 806
V (C <sub>16:0</sub> , NMe)	3	1244	414, 617, 820, 1023
V (C <sub>18:1</sub> )	1	1256	426, 629, 832
V (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3	1270	440, 643, 846, 1049
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	2,3	1350	440, -, 846, 1049

Con números romanos se indica el número de unidades de GlcNAc que componen el esqueleto de los factores Nod. Entre paréntesis se indica la longitud y grado de insaturación del ácido graso y, en su caso, los distintos sustituyentes que presentan ordenados en sentido horario desde la posición del ácido graso (Spaink, 1992). NMe: *N*-metilo, S: sulfato, dNAC: sin *N*-acetilo.

\*Tipo de sustituyentes. Tipo 1: sin sustituyentes; tipo 2: grupo sulfato; tipo 3: *N*-metilo y tipo 8: sin *N*-acetilo en alguna glucosamina del esqueleto.

Estudios previos de nuestro grupo indicaron que todos los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 al ser inducida con apigenina son tetrámeros y pentámeros de GlcNAc, portadores de distintos sustituyentes en sus extremos reductor y no reductor (Tabla I del Apéndice). En la Tabla VI del Apéndice se ha recogido el estudio comparativo de los factores Nod producidos por CIAT899 y C9 en las distintas condiciones. En ella se aprecia que 6 de los factores producidos por C9 en medio B<sup>-</sup> con apigenina son sintetizados también por CIAT899. Los factores V(C<sub>16:0</sub>, NMe, dNAC), V(C<sub>18:1</sub>) y V(C<sub>18:1</sub>, NMe, dNAC) fueron producidos exclusivamente por el mutante C9. Además, 5 de los factores producidos por C9 con apigenina y NaCl fueron también

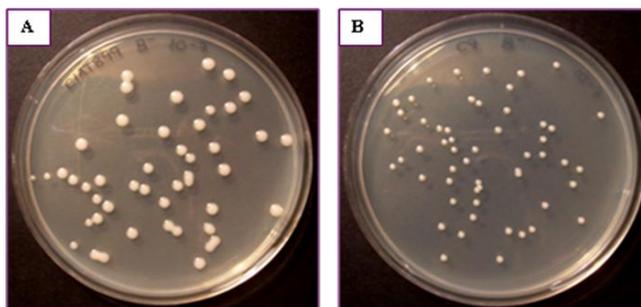
## Resultados

producidos por CIAT899 en la misma condición, siendo los factores V (C<sub>16:0</sub>, NMe, dNAc) y IV (C<sub>18:1</sub>, NMe, dNAc) producidos exclusivamente por C9. Los resultados indican que la mutación en el gen *bgvA* disminuye la diversidad estructural de los factores Nod producidos con apigenina e impide su producción en ausencia de este flavonoide.

### 5.4. ESTUDIO DE LOS COMPONENTES SUPERFICIALES DEL MUTANTE C9.-

#### 5.4.1. MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS DEL MUTANTE C9.-

Como se ilustra en la **Figura R64**, para el mismo tiempo de cultivo, el mutante C9 desarrolla colonias más pequeñas y de mucosidad algo más oscura que CIAT899 en medio B<sup>-</sup>. El tamaño de las colonias de C9 también fue inferior al de CIAT899 en los medios YM y TY (resultados no mostrados).



**Figura R64.-** Aspecto de las colonias de *R. tropici* CIAT899 (**panel A**) y del mutante C9 (**panel B**) a los tres días de crecimiento en medio B<sup>-</sup>.

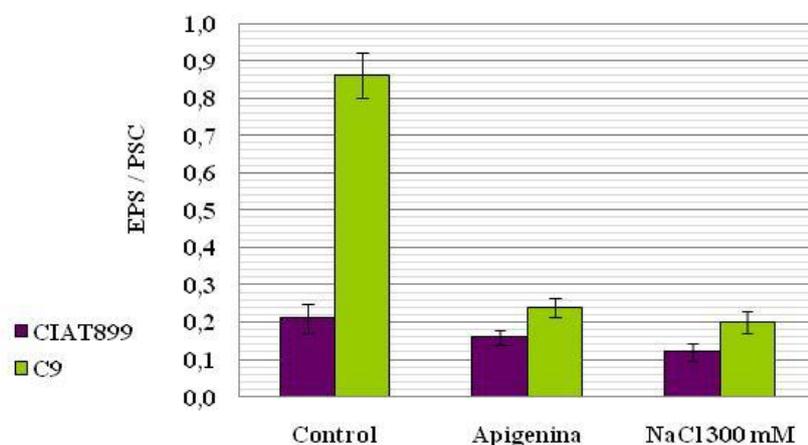
#### 5.4.2. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS.-

##### 5.4.2.1. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE EPS EN MEDIO LÍQUIDO.-

Puesto que la región en la que se localiza el gen *bgvA* de *R. tropici* CIAT899 contiene genes relacionados con la síntesis y transporte de polisacáridos (**Apartado 5.1.2**), estudiamos si la mutación en el gen *bgvA* afecta a la producción de EPS. En primer lugar, se extrajeron los EPS producidos por CIAT899 y el mutante C9 en medio B<sup>-</sup>, medio B<sup>-</sup> con apigenina y medio B<sup>-</sup> con 300mM de NaCl. Para facilitar la comparación de los resultados, se dividió el peso seco del EPS por el peso seco de las células totales del cultivo. Los resultados se muestran en la **Figura R65**.

La producción de EPS de CIAT899 en medio B<sup>-</sup> disminuye ligeramente con apigenina, y se reduce aproximadamente a la mitad con NaCl 300 mM. Por otra parte, la cantidad de EPS producido por el mutante C9 fue significativamente superior a la de CIAT899 en todas las condiciones. El EPS producido por el mutante C9 en las

condiciones control superó en casi cinco veces a la cantidad producida por CIAT899. Con apigenina y con estrés salino la producción de EPS del mutante C9 sufrió una caída drástica, aunque en ambos casos la cantidad de EPS producida por C9 fue similar a la de CIAT899 sin inductores.



Estirpe	U.F.C./mL		EPS (mg/100mL)	PSC (mg/100mL)	EPS/PSC	
	Inicial	Final				
Control	CIAT899	6,7 x 10 <sup>6</sup> a	2,7 x 10 <sup>9</sup> a	106 bc	530 b	0,20 bc
	C9	6,5 x 10 <sup>6</sup> ab	3,0 x 10 <sup>9</sup> a	468 a	540 a	0,87 a
Apigenina	CIAT899	6,0 x 10 <sup>6</sup> c	2,6 x 10 <sup>9</sup> a	82 cd	512 d	0,16 cd
	C9	6,1 x 10 <sup>6</sup> c	2,8 x 10 <sup>9</sup> a	127 b	528 b	0,24 b
NaCl 300 mM	CIAT899	6,1 x 10 <sup>6</sup> c	2,6 x 10 <sup>9</sup> a	62 d	517 c	0,12 d
	C9	6,2 x 10 <sup>6</sup> bc	2,7 x 10 <sup>9</sup> a	108 bc	532 b	0,20 bc

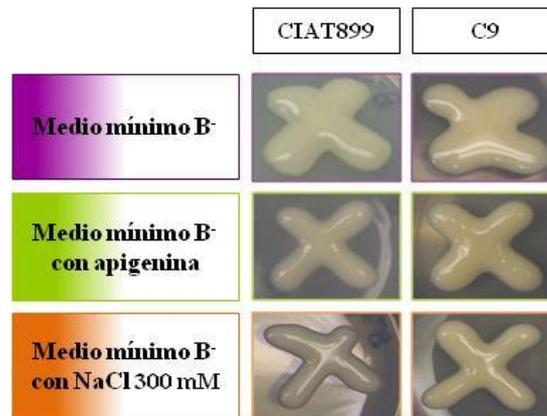
**Figura R65.-** Cuantificación del EPS producido por *R. tropici* CIAT899 y el mutante C9 en medio B<sup>-</sup> (control), medio B<sup>-</sup> con apigenina (1 µg/mL) y medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM. Los datos son media de tres repeticiones independientes. Las letras “a”, “b”, “c” y “d” dentro de cada columna identifican grupos de datos significativamente distintos al nivel del 5%. PSC: peso seco de las células totales.

#### 5.4.2.2. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE EPS EN MEDIO SÓLIDO.-

La producción de EPS se evaluó visualmente observando la mucosidad producida por CIAT899 y el mutante C9 en medio B<sup>-</sup> sólido, tanto en las condiciones control como con apigenina (1 µg/mL) y con NaCl 300mM. En la **Figura R66** se muestran los resultados obtenidos. En todas las condiciones se observó un aspecto más amarillento en la mucosidad del mutante C9 que en la de CIAT899, que resultó siempre de color blanco. Estas diferencias se hicieron más evidentes a medida que aumentaba el tiempo de cultivo. Por otra parte, y de acuerdo con los resultados obtenidos en los cultivos líquidos, se observó que en las placas con apigenina y con NaCl la mucosidad

## Resultados

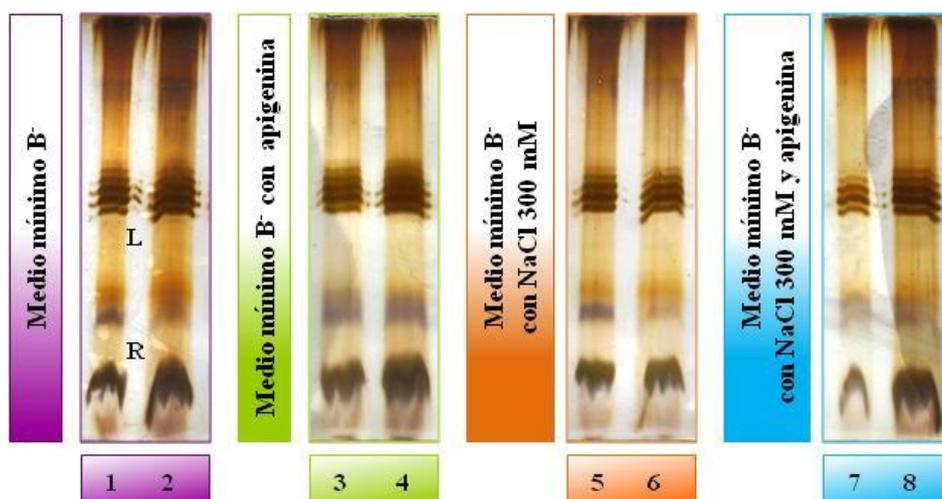
de ambas bacterias fue menor y su crecimiento más lento que en las condiciones control. No obstante, el mutante C9 creció más rápido que CIAT899 en todas las condiciones.



**Figura R66.-** Aspecto de la mucosidad producida por *R. tropici* CIAT899 y el mutante C9 a los 5 días de crecimiento en medio B<sup>-</sup>, medio B<sup>-</sup> con apigenina (1µg/mL) y medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM.

### 5.4.3. ANÁLISIS DEL PERFIL DE LIPOPOLISACÁRIDOS.-

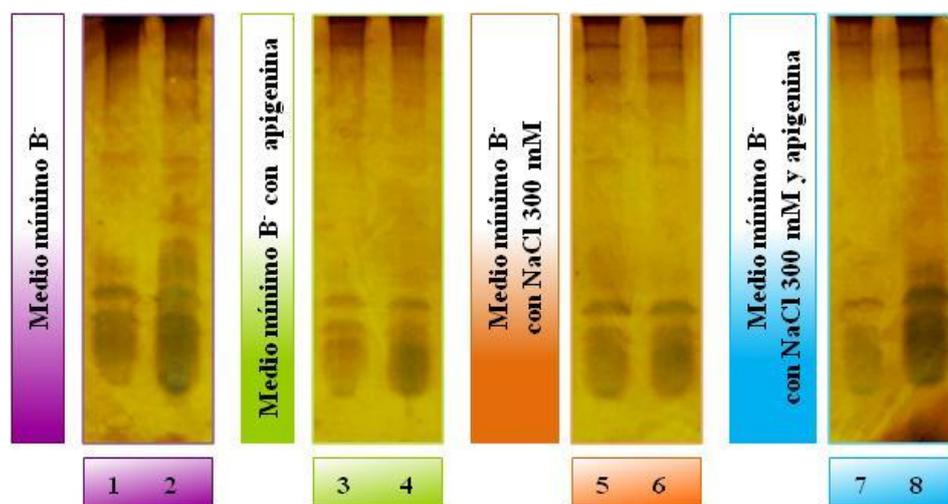
Se extrajeron los LPS de CIAT899 y de C9 en medio B<sup>-</sup>, tanto en condiciones control, como con apigenina (1 µg/mL) y con NaCl 300 mM, y se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE y tinción con plata. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura R67**, en la que se observa que ni la apigenina ni el NaCl 300 mM afectan al perfil de LPS de CIAT899 (**carriles impares**). Además, el perfil de LPS del mutante C9 (**carriles pares**) no mostró cambios frente al perfil de la estirpe silvestre en ninguna de las condiciones.



**Figura R67.-** Perfil de LPS de *R. tropici* CIAT899 (**carriles impares**) y del mutante C9 (**carriles pares**) en medio B<sup>-</sup>, medio B<sup>-</sup> con apigenina (1 µg/mL), medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM y medio B<sup>-</sup> con apigenina y NaCl 300 mM. **L:** fracción de LPS liso; **R:** fracción de LPS rugoso.

#### 5.4.4. ANÁLISIS DEL PERFIL DE POLISACÁRIDOS CAPSULARES TIPO ANTÍGENO K.-

De forma similar, se realizó un estudio comparativo del perfil de los polisacáridos capsulares tipo antígeno K (KPS) producidos por CIAT899 y el mutante C9 en medio B<sup>-</sup>, tanto en condiciones control, como con apigenina (1 µg/mL) y con NaCl 300 mM. En la **Figura R68** se aprecia que la señal detectada en los carriles del mutante C9 (**carriles pares**) es algo más intensa que la de CIAT899 (**carriles impares**) en todas las condiciones, lo que podría deberse al mayor crecimiento de C9 en este medio. Además, es clara la presencia de algunas bandas en la parte superior del perfil de KPS de ambas bacterias cuando se cultivan con NaCl 300 mM (**carriles de 5 a 8**). En su conjunto, los resultados obtenidos indican que no existen diferencias significativas en los perfiles de KPS de la estirpe silvestre y del mutante C9.



**Figura R68.-** Perfil de KPS de *R. tropici* CIAT899 (**carriles impares**) y del mutante C9 (**carriles pares**) en medio B<sup>-</sup>, medio B<sup>-</sup> con apigenina (1 µg/mL), medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM y medio B<sup>-</sup> con apigenina y NaCl 300 mM.

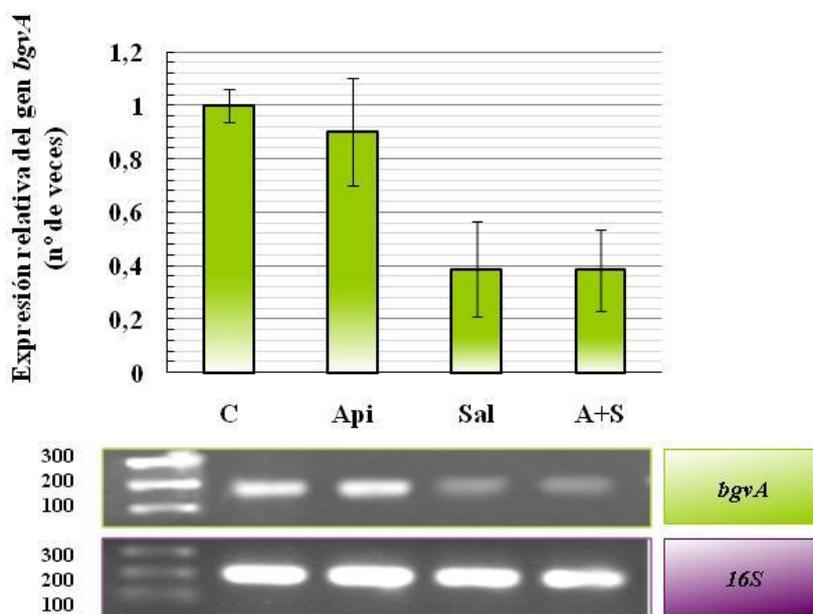
#### 5.5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *bgvA*.-

Se analizó la expresión del gen *bgvA* en las condiciones que inducen la expresión de los genes *nod* en *R. tropici* CIAT899. Para ello, se realizaron experimentos de RT-PCR cuantitativa en los que se utilizó la pareja de cebadores BGV3-F y BGV3-R y como molde en la reacción se empleó ADNc retrotranscrito a partir del ARN aislado de cultivos de CIAT899 en medio B<sup>-</sup>, medio B<sup>-</sup> con apigenina (1 µg/mL), con NaCl 300 mM y con apigenina y NaCl 300 mM. Se realizó una cuantificación relativa del nivel de expresión del gen *bgvA* frente a la expresión registrada en ausencia de inductores (valor 1), y se empleó como normalizador de los datos el nivel de expresión del gen que

## Resultados

codifica el ARNr 16S de *R. tropici* CIAT899, cuyo nivel de expresión no difirió en las distintas condiciones analizadas.

Como se observa en la **Figura R69**, cuando CIAT899 creció con apigenina (**Api**), el gen *bgvA* presentó el mismo nivel de expresión que en ausencia de inductores (**C**). Sin embargo, con NaCl 300 mM y con NaCl 800 mM y apigenina (**Sal** y **A+S**), el nivel de expresión de *bgvA* se redujo aproximadamente a la mitad en relación al nivel registrado en las condiciones control (**C**). Estos resultados indican que la expresión del gen *bgvA* es independiente del flavonoide apigenina y que disminuye con estrés salino.

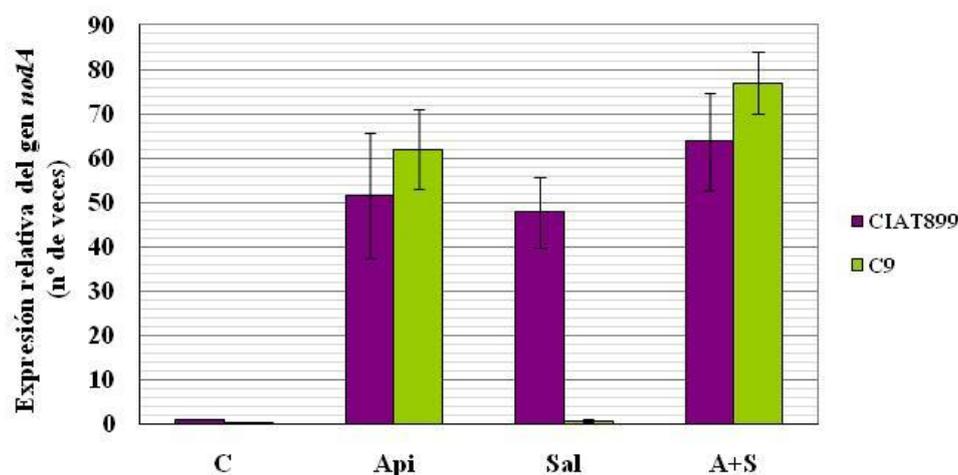


**Figura R69.-** Análisis por RT-PCR cuantitativa del ARNm extraído de *R. tropici* CIAT899 en medio B<sup>-</sup> (**C**), medio B<sup>-</sup> con apigenina (1µg/mL) (**Api**), medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM (**Sal**) y medio B<sup>-</sup> con apigenina y NaCl 300 mM (**A+S**). Se utilizaron los cebadores BGV3-F y BGV3-R para amplificar un fragmento interno del gen *bgvA* de ~ 167 pb. El gen que codifica el ARNr 16S se usó como referencia. Se muestran los valores relativos a la expresión de *bgvA* en ausencia de inductores de los genes *nod* (valor 1). Las medidas fueron realizadas por duplicado en tres experimentos independientes. Las barras indican las desviaciones estándar. Los tamaños de los marcadores de peso molecular (pb) se indican a la izquierda de la fotografía.

### 5.6. EFECTOS DE LA MUTACIÓN DEL GEN *bgvA* EN LA EXPRESIÓN DEL GEN *nodA* DE *R. tropici* CIAT899.-

Para comparar el perfil de expresión del gen *nodA* en la estirpe silvestre y en el mutante C9, se realizaron experimentos de RT-PCR cuantitativa utilizando la pareja de cebadores NodACIATRT-F y NodACIATRT-R. Se tomó como molde ADNc retrotranscrito a partir del ARN aislado de cultivos de CIAT899 y de C9 en medio B<sup>-</sup>,

medio B<sup>-</sup> con apigenina (1 µg/mL), medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM, y medio B<sup>-</sup> con apigenina y NaCl 300 mM. El nivel de expresión del gen *nodA* se cuantificó en relación a su expresión en CIAT899 en ausencia de inductores (valor 1). Para la normalización de los datos se utilizó el gen que codifica el ARNr 16S en *R. tropici* CIAT899, cuya expresión no difirió de forma significativa en las distintas condiciones analizadas. En la **Figura R70** se observa que, tanto la apigenina como el NaCl 300 mM inducen la expresión del gen *nodA* en CIAT899. Además, con apigenina el nivel de expresión de *nodA* en el mutante C9 no difirió respecto al de CIAT899 (**Api**). Sin embargo, con NaCl 300 mM, *nodA* se expresó en CIAT899 pero no en el mutante C9. Con apigenina y NaCl 300 mM no se detectaron diferencias significativas en la expresión de *nodA* entre CIAT899 y C9 (**A+S**). En su conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que el gen *bgvA* podría estar implicado, al menos de forma indirecta, en la activación de la expresión de los genes *nod* y en la consecuente producción de factores Nod que ocurre en *R. tropici* CIAT899 bajo estrés salino sin flavonoides.



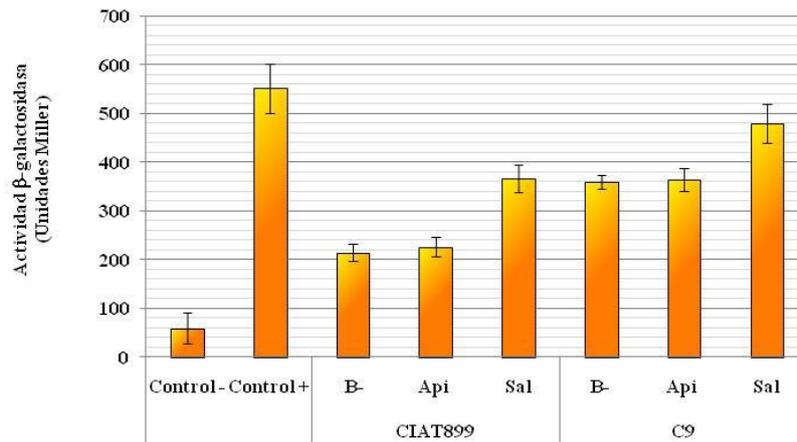
**Figura R70.-** Cuantificación relativa de la expresión del gen *nodA* en *R. tropici* CIAT899 y en el mutante C9 en medio B<sup>-</sup> (C), medio B<sup>-</sup> con apigenina (1µg/mL) (**Api**), medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM (**Sal**) y medio B<sup>-</sup> con apigenina y NaCl 300 mM (**A+S**). Se muestran los valores relativos a la expresión obtenida en *R. tropici* CIAT899 en ausencia de inductores de los genes *nod* (valor 1). Las medidas se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes. Las barras verticales indican las desviaciones estándar.

### 5.7. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE AHL POR EL MUTANTE C9.-

Se comparó la capacidad de producción de autoinductores de CIAT899 y C9 en medio mínimo B<sup>-</sup>, con y sin NaCl 300 mM. La cuantificación se realizó mediante el ensayo de la actividad β-galactosidasa en la estirpe indicadora NT1[pZLR4] de *A. tumefaciens*. Los resultados obtenidos (**Figura R71**), indicaron que tanto CIAT899

## Resultados

como C9 producen autoinductores en medio B<sup>-</sup> y que la apigenina no afecta a su producción. Además, cuando ambas estirpes crecieron con NaCl 300 mM (**Sal**) se detectó una mayor producción de autoinductores que cuando crecieron sin estrés (**B<sup>-</sup>** y **Api**). La actividad β-galactosidasa de C9 fue significativamente superior a la de CIAT899 (**B<sup>-</sup>**, **Api** y **Sal**), lo que indicó que el mutante C9 es mayor productor de autoinductores que la estirpe silvestre en todas las condiciones analizadas.



**Figura R71.-** Actividad β-galactosidasa de *A. tumefaciens* NT1[pZLR4] crecida en YM con el sobrenadante de cultivos de *R. tropici* CIAT899 y del mutante C9 en medio B<sup>-</sup> (**B<sup>-</sup>**), medio B<sup>-</sup> con apigenina (1 μg/mL) (**Api**) y medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM (**Sal**). Control positivo (+): NT1[pZLR4] en YM con gentamicina (30 μg/mL) y OHHL (5μg/mL). Control negativo (-): NT1[pZLR4] en YM con gentamicina. Las medidas de la actividad β-galactosidasa fueron realizadas por triplicado en dos experimentos independientes. Las barras verticales indican las desviaciones estándar.

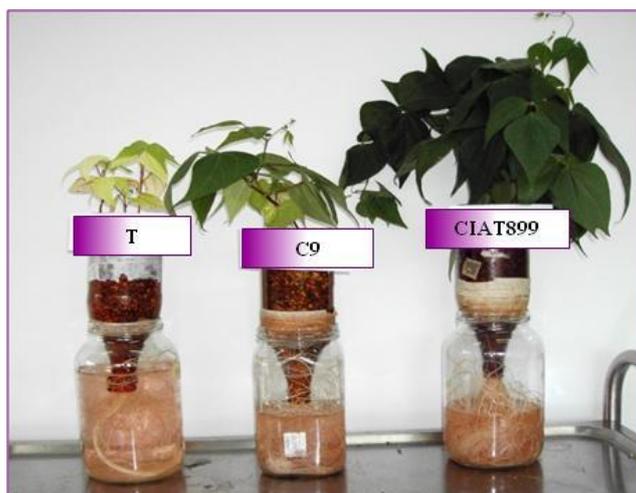
## 5.8. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES SIMBIÓTICAS DEL MUTANTE C9.-

### 5.8.1. EFICIENCIA EN LA NODULACIÓN.-

Como se observa en la **Tabla R17**, el número de nódulos producidos en las plantas de judía inoculadas con el mutante C9 fue significativamente inferior al producido en las inoculadas con CIAT899. Las diferencias en la masa seca de los nódulos y la masa seca de la parte aérea de las plantas inoculadas con CIAT899 y con C9 también fueron estadísticamente significativas. Todo ello nos indica que el mutante C9 es menos eficiente que CIAT899 en la nodulación de las plantas de judía. En la **Figura R72** se aprecia con claridad el mayor tamaño y verdor de las plantas inoculadas con CIAT899 en comparación con las inoculadas con el mutante C9, que difieren, a su vez, de las plantas testigo sin inocular.

**Tabla R17.-** Eficiencia de *R. tropici* CIAT899 y del mutante C9 en la nodulación de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa. Los datos son media de 4 repeticiones independientes. Para cada parámetro analizado las letras “a”, “b” y “c” identifican grupos de datos significativamente distintos al nivel del 5%. T: plantas control no inoculadas.

Tratamientos	Nódulos		Masa seca parte aérea (g/planta)
	Número/planta	Masa seca (mg/planta)	
CIAT899	1402,2 a	416,37 a	4,86 a
C9	744,4 b	183,25 b	1,34 b
T	0	0	0,23 c



**Figura R72.-** Plantas de *P. vulgaris* L. cv. Negro Jamapa al mes y medio de la inoculación con *R. tropici* CIAT899 y con el mutante C9. T: planta testigo sin inocular.

En la **Tabla R18** se aprecia que las plantas de leucena inoculadas con C9 desarrollaron el mismo número de nódulos que las inoculadas con CIAT899, y el peso alcanzado por éstos no difirió entre los dos tratamientos. Sin embargo, la inoculación con CIAT899 dio lugar a una mayor masa seca de parte aérea de las plantas que la inoculación con el mutante C9 (**Figura R73**).

**Tabla R18.-** Eficiencia de *R. tropici* CIAT899 y del mutante C9 en la nodulación de *L. leucocephala*. Los datos son media de 4 repeticiones independientes. Para cada parámetro analizado las letras “a”, “b” y “c” identifican grupos de datos significativamente distintos al nivel del 5%. T: plantas control no inoculadas.

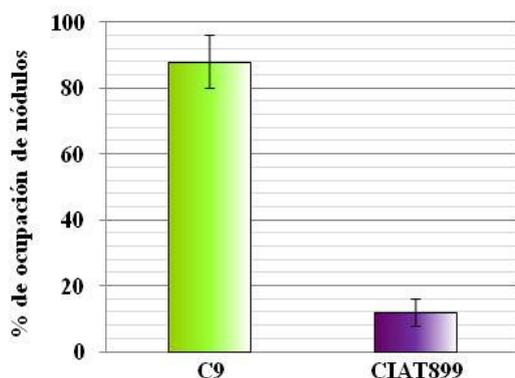
Tratamientos	Nódulos		Masa seca parte aérea (g/planta)
	Número/planta	Masa seca (mg/planta)	
CIAT899	9,6 a	20,16 a	0,29 a
C9	9,3 a	19,11 a	0,17 b
T	0	0	0,63 c



**Figura R73.-** Plantas de *L. leucocephala* a los dos meses de la inoculación con *R. tropici* CIAT899 y con el mutante C9. T: planta testigo sin inocular.

### 5.8.2. COMPETITIVIDAD POR LA NODULACIÓN.-

Se realizaron ensayos de competitividad coinoculando CIAT899 y el mutante C9 en proporción 1:1 (v/v) sobre semillas de judía pregerminadas. Las plantas se recolectaron tras un mes de incubación, y se determinó la ocupación de los nódulos transfiriendo las bacterias aisladas de ellos a placas de medio TY con los antibióticos adecuados para distinguir entre la estirpe silvestre (Rif<sup>R</sup>) y la mutante (Rif<sup>R</sup>, Km<sup>R</sup>). Como se muestra en la **Figura R74**, el mutante C9 fue más competitivo que CIAT899 y ocupó el 89% de los nódulos. El verdor y aspecto de las plantas coinoculadas con CIAT899 y C9 fue similar al de las plantas que fueron inoculadas con el mutante C9 en los ensayos de nodulación (**Apartado 5.8.1**). Estos resultados indican que la mutación en el gen *bgvA* incrementa la capacidad competitiva de *R. tropici* CIAT899 en plantas de judía.

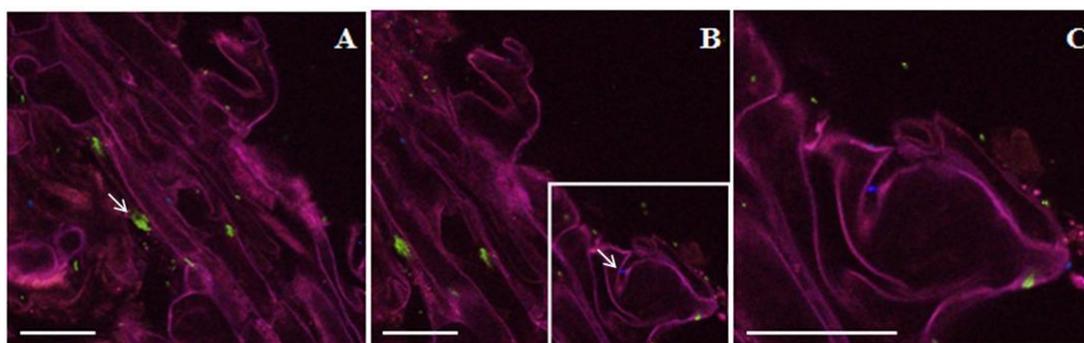


**Figura R74.-** Capacidad competitiva de *R. tropici* CIAT899 y del mutante C9 por la ocupación de los nódulos de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa. Se muestran los resultados de dos ensayos independientes y el aspecto de las plantas coinoculadas con *R. tropici* CIAT899 y el mutante C9 en proporción 1:1. Las barras verticales indican las desviaciones estándar.

### 5.8.3. COLONIZACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LA RAÍZ.-

Los resultados mencionados hasta ahora indican que, a pesar de ser menos eficiente en la nodulación, el mutante C9 es más competitivo que *R. tropici* CIAT899 en la ocupación de los nódulos en plantas de judía. Por ello, se analizó la influencia de la mutación del gen *bgvA* en estadios más tempranos de la simbiosis *R. tropici* CIAT899 - *P. vulgaris* bv. Negro Jamapa. Para ello, las bacterias CIAT899 y C9 fueron marcadas con los plásmidos pMP4641 y pMP4655, que codifican las proteínas de fluorescencia azul (BFP) y verde (GFP) respectivamente. Ambas estirpes, marcadas con diferentes proteínas de fluorescencia, se coinocularon en proporción 1:1 (v/v) sobre semillas de judía pregerminadas. Tras una semana de crecimiento de las plantas se observó la colonización de las raíces por ambas bacterias al microscopio confocal en el Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS).

De acuerdo con los datos obtenidos en los ensayos de competitividad, los resultados indican que al coinocular con ambas bacterias, el mutante C9 coloniza la superficie de las raíces con mayor eficiencia que CIAT899. La **Figura R75** muestra la existencia de microcolonias de C9[pMP4655] (fluorescencia verde) junto a escasas células aisladas de CIAT899[pMP4641] (fluorescencia azul), todas adheridas a la superficie de la misma raíz.



**Figura R75.-** Microfotografía de fluorescencia de una raíz de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa colonizada por CIAT899[pMP4641] (fluorescencia de color azul) y C9[pMP4655] (fluorescencia de color verde) a la semana de su coinoculación sobre semillas pregerminadas. **Panel A:** microcolonias de C9[pMP4655] adheridas a la superficie de la raíz; **panel B:** microcolonia de CIAT[pMP4641] próxima a otras dos de C9[pMP4655], y **panel C:** ampliación del detalle recuadrado en el panel B. Barras: 50  $\mu$ m.

### 5.9. COMPLEMENTACIÓN DE LA MUTACIÓN EN EL GEN *bgvA*.-

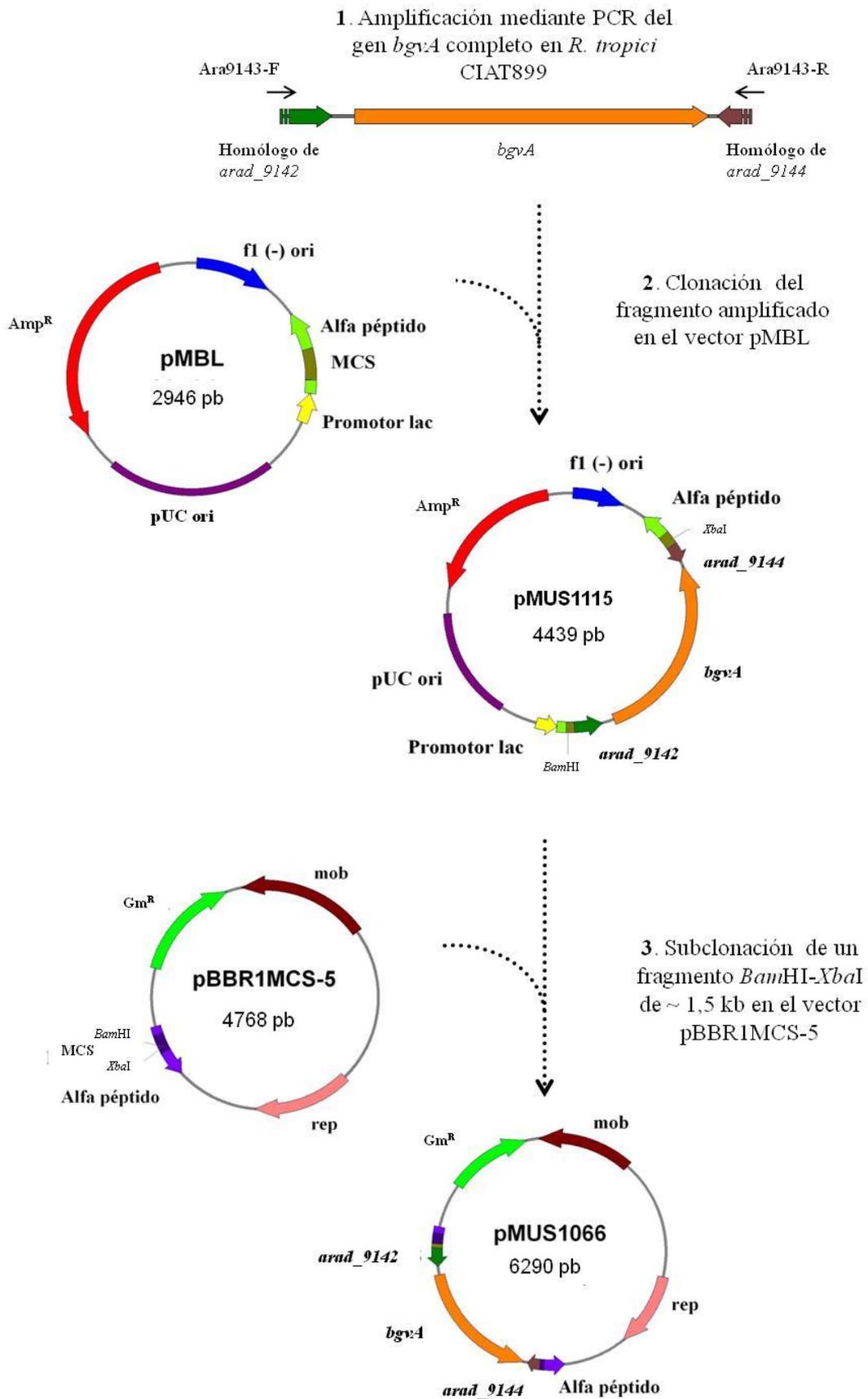
Para complementar al mutante C9 se amplificó mediante PCR el gen *bgvA* en *R. tropici* CIAT899 empleando los cebadores externos al gen Ara9143-F y Ara9143-R, y

## Resultados

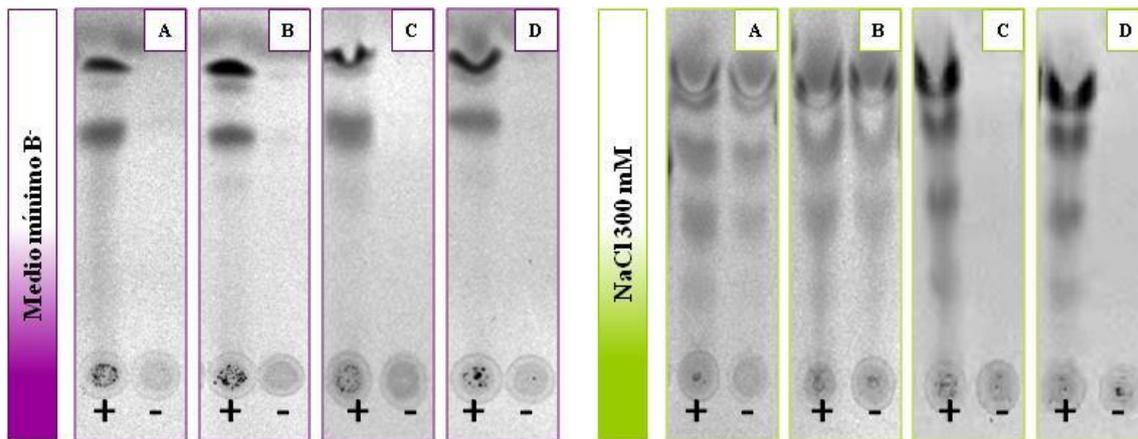
el producto de la reacción se clonó en el vector pMBL (Dominion MBL), generando así el plásmido pMUS1115. Posteriormente, se subclonó el fragmento *Bam*HI-*Xba*I de ~ 1,5 kb, que contenía el gen *bgvA*, en el vector de clonación pBBR1MCS-5 digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante se denominó pMUS1066 (**Figura R76**), y se transfirió por conjugación a CIAT899 y al mutante C9. Como se puede observar en la **Figura R77**, la estirpe CIAT899[pMUS1066] (**paneles B**) mostró el mismo perfil de producción de factores Nod que CIAT899 (**paneles A**), lo que indicó que la presencia de dos copias silvestres del gen *bgvA* no afecta a la característica analizada. Por otra parte, la estirpe C9[pMUS1066] no recuperó los rasgos fenotípicos de la estirpe silvestre en cuanto a producción de factores Nod bajo estrés salino sin inductor (**paneles D**). Es decir, el fragmento de ADN que contiene al gen *bgvA*, presente en el inserto de pMUS1066, no complementó el fenotipo del mutante C9.

Dada la imposibilidad de complementar la mutación mediante la transferencia del plásmido que porta una copia silvestre del gen, se amplificó mediante PCR el hipotético operón al que pertenece *bgvA* en *R. tropici* CIAT899, empleando los cebadores Opara9143-F y Opara9143-R. El producto de la reacción se clonó en el vector pMBL (Dominion MBL), generando así el plásmido pMUS1060. Posteriormente, el fragmento *Bam*HI-*Xba*I de ~ 7,1 kb, que contenía la región amplificada, se subclonó en el vector de clonación pBBR1MCS-5. El plásmido resultante se denominó pMUS1067 (**Figura R78**).

A continuación, pMUS1067 se transfirió mediante conjugación a la estirpe silvestre CIAT899 y al mutante C9. Como se observa en la **Figura R79**, tanto en ausencia como en presencia de estrés salino, CIAT899[pMUS1067] (**paneles B**) mostró el mismo perfil de producción de factores Nod que CIAT899 (**paneles A**), en tanto que C9[pMUS1067] (**paneles D**) no recuperó la producción de factores Nod bajo estrés salino sin apigenina, y mostró el mismo perfil que el mutante C9 en todas las condiciones (**paneles C**). Por tanto, ni el fragmento clonado en el plásmido pMUS1066, que contiene el gen *bgvA*, ni los genes incluidos en la secuencia clonada en el plásmido pMUS1067 complementan la producción de factores Nod en el mutante C9 bajo estrés salino sin apigenina.



**Figura R76.-** Esquema de la construcción *in vitro* del plásmido pMUS1066 usado para complementar la mutación en el gen *bgvA* de *R. tropici* CIAT899. MCS: sitio de clonación múltiple.

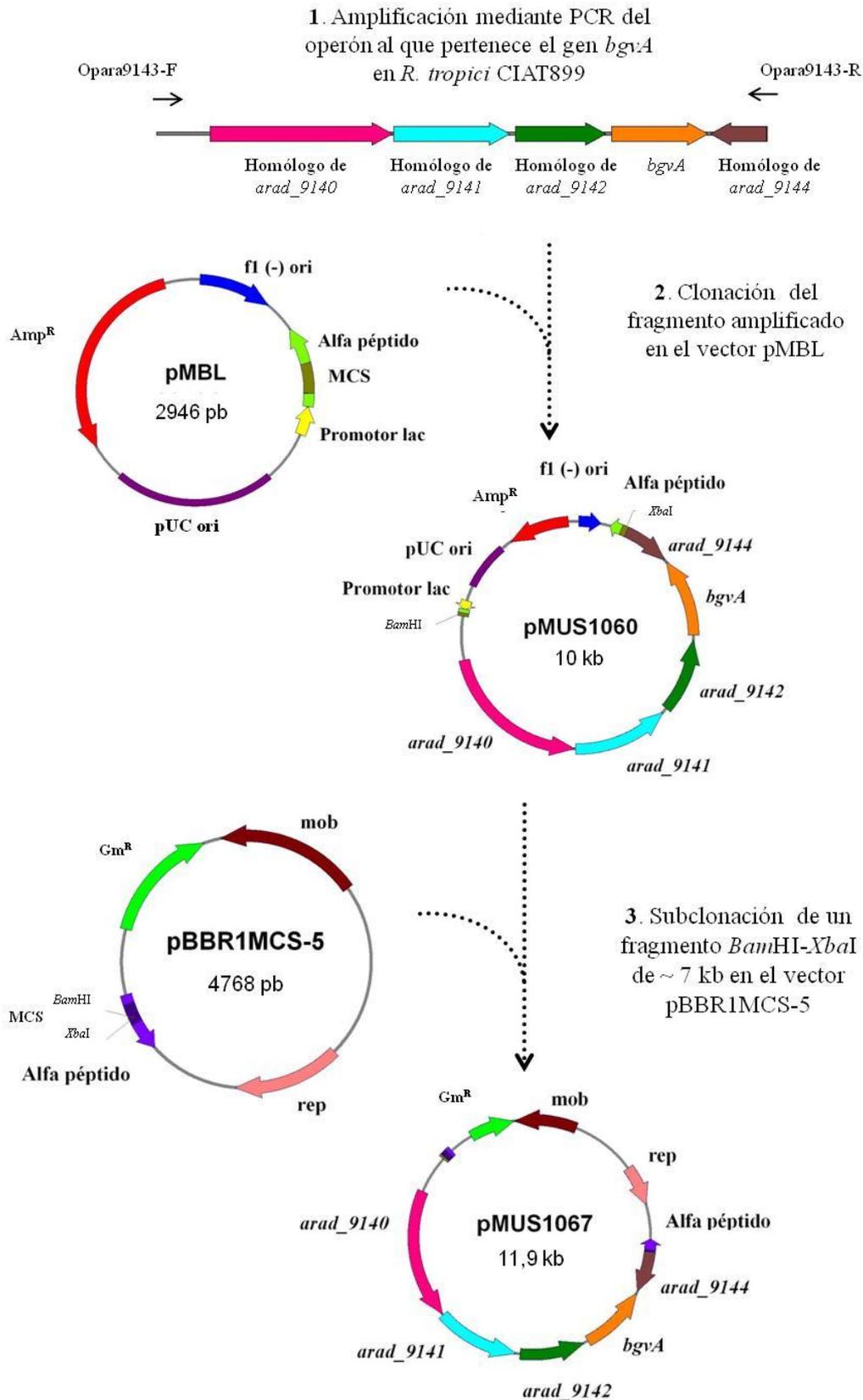


**Figura R77.-** Análisis mediante cromatografía en capa fina de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899, CIAT899[pMUS1066], C9 y C9[pMUS1066] en medio B con y sin NaCl 300 mM. **Paneles A.-** CIAT899, **paneles B.-** CIAT899[pMUS1066], **paneles C.-** C9, y **paneles D.-** C9[pMUS1066]. Los carriles con signo positivo corresponden a los cultivos inducidos con 1 µg/mL de apigenina.

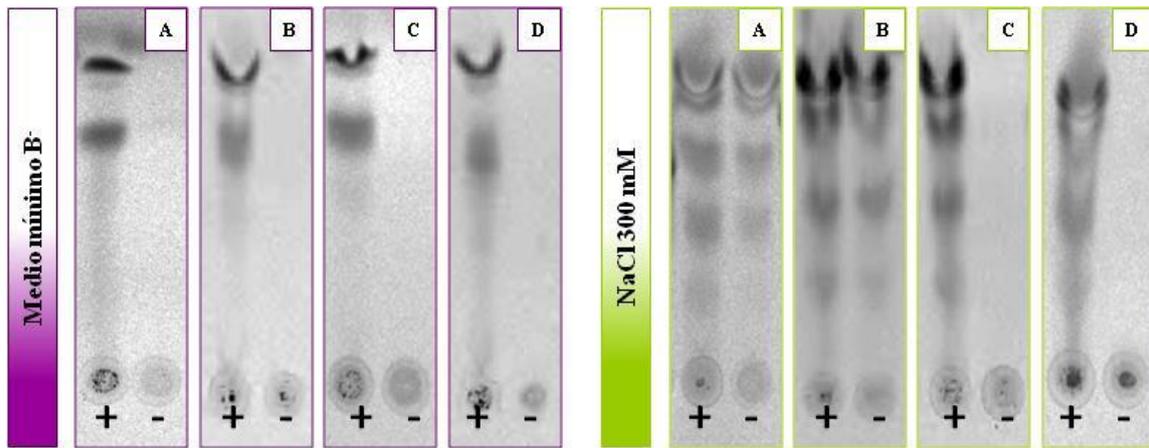
### 5.10. CONSTRUCCIÓN DE UN MUTANTE EN EL GEN *bgvA* MEDIANTE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.-

Dado que no se pudo complementar al mutante C9, se procedió a interrumpir el gen *bgvA* de forma dirigida con el interposón  $\Omega$ . Este elemento está contenido en el plásmido pHP45 $\Omega$  (Prentki & Krisch, 1984) y codifica resistencia al antibiótico espectinomomicina. El cassette  $\Omega$  provoca una interrupción completa de la transcripción del gen donde está inserto al portar secuencias terminadoras de la transcripción (mutación polar).

Para la construcción del mutante, el gen *bgvA* de *R. tropici* CIAT899 se amplificó por PCR con los cebadores Ara9143-F y Ara9143-R, y se clonó en el vector pGEM-T Easy, obteniéndose así el plásmido pMUS1072. Este plásmido se digirió con *Hind*III y se ligó con el fragmento de 2 kb del interposón  $\Omega$ , obtenido por digestión de pHP45 $\Omega$  con la misma enzima, generando así el plásmido pMUS1073. Por último, se subclonó en el vector pK18mob (Km<sup>R</sup>) el fragmento *Eco*RI de ~ 3,5 kb, que contenía el gen *bgvA* mutado en *Hind*III con el interposón  $\Omega$ , originando el plásmido pMUS1075 (**Figura R80**).

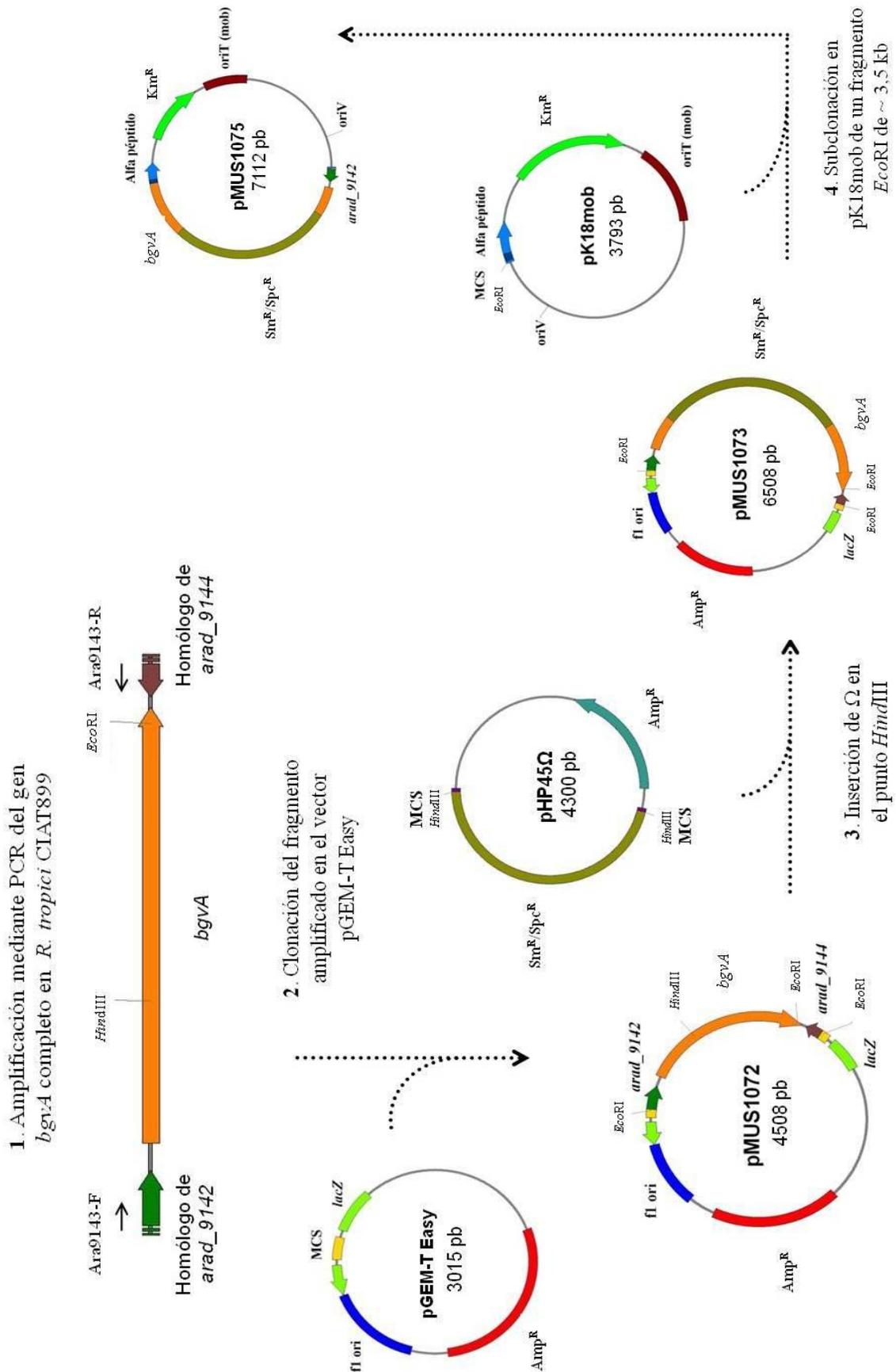


**Figura R78.-** Esquema de la construcción *in vitro* del plásmido pMUS1067 usado para complementar la mutación en el gen *bgvA* de *R. tropici* CIAT899. MCS: sitio de clonación múltiple.

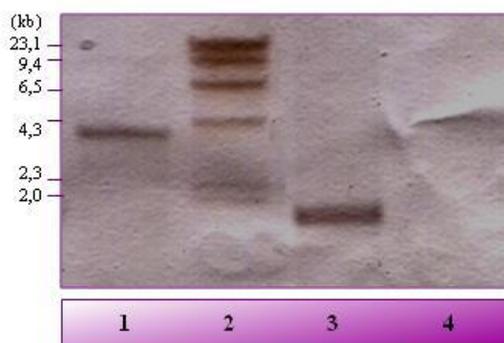


**Figura R79.-** Análisis mediante cromatografía en capa fina de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899, CIAT899[pMUS1067], C9 y C9[pMUS1067] en medio B<sup>-</sup> con y sin NaCl 300 mM. **Paneles A.-** CIAT899, **paneles B.-** CIAT899[pMUS1067], **paneles C.-** C9 y **paneles D.-** C9[pMUS1067]. Los carriles con signo positivo corresponden a los cultivos inducidos con 1 µg/mL de apigenina.

Posteriormente, el plásmido pMUS1075 se transfirió a CIAT899 por conjugación y se seleccionaron los transconjugantes resistentes a espectinomicina y sensibles a kanamicina, en los que se había producido un evento de doble recombinación en el que la copia silvestre del gen *bglA* fue reemplazada por la copia mutada con el interposón  $\Omega$ . El mutante obtenido se denominó SVQ689 (*R. tropici* CIAT899 *bglA*:: $\Omega$ ). La homogenización de la mutación se confirmó mediante hibridación, digiriendo el ADN genómico de CIAT899 y de SVQ689 con *EcoRI*, y empleando como sonda de hibridación el producto de PCR de ~ 1500 pb amplificado con los cebadores Ara9143-F y Ara9143-R, tomando como molde ADN genómico de CIAT899, e incorporando en la reacción nucleótidos marcados con digoxigenina. Como se aprecia en la **Figura R81**, tanto en CIAT899 (**carril 3**) como en SVQ689, un único fragmento de ADN hibridó con la sonda, lo que confirmó la existencia de una única copia del gen *bglA* en ambas estirpes. El tamaño de la banda que hibridó con la sonda fue de ~ 1600 pb en CIAT899 (**carril 4**), y en el mutante SVQ689 la banda sufrió el incremento de tamaño esperado (~ 3600 pb) (**carril 1**).



**Figura R80.-** Esquema de la mutagénesis *in vitro* del gen *bgvA* de *R. tropici* CIAT899 mediante la inserción del interposón Ω.



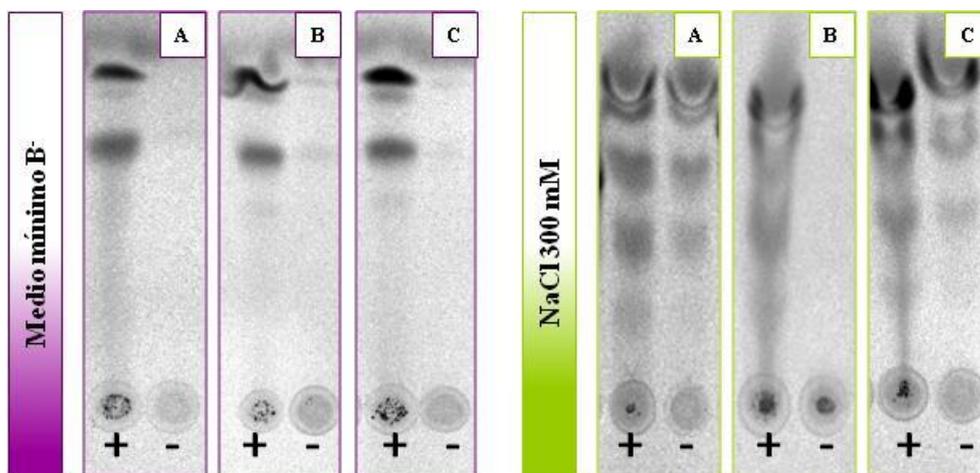
**Figura R81.-** Comprobación mediante hibridación de la construcción de un mutante de *R. tropici* CIAT899 en el gen *bgvA*. **Carril 1.-** ADN genómico de SVQ689 (*R. tropici* CIAT899 *bgvA::Ω*), **carril 2.-** marcador  $\lambda$ -*Hind*III marcado con digoxigenina, **carril 3.-** ADN genómico de CIAT899 y **carril 4.-** control negativo sin ADN. El ADN fue digerido con la endonucleasa de restricción *Eco*RI. Los tamaños del marcador (kb) se muestran a la izquierda de la figura.

A continuación, se analizó el crecimiento de la estirpe mutante SVQ689 frente al de la estirpe silvestre CIAT899 en medio B<sup>-</sup>, medio B<sup>-</sup> con apigenina (1 μg/mL) y medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM. Los resultados indicaron que, a diferencia de lo que ocurría con el mutante C9, cuya velocidad de crecimiento fue superior a la de CIAT899 en todas las condiciones (**Apartado 5.2**), el crecimiento del mutante SVQ689 fue similar al de la estirpe silvestre en todas las condiciones (datos no mostrados). Igualmente, se analizó el perfil de los factores Nod producidos por SVQ689 y se comparó con los perfiles de la estirpe silvestre CIAT899 y del mutante C9 en las mismas condiciones. En la **Figura R82** se puede apreciar que el nuevo mutante en *bgvA*, SVQ689, produjo factores Nod en medio B<sup>-</sup> (**paneles C**), siendo su perfil similar al de CIAT899 (**paneles A**) y diferente del de C9 en condiciones de estrés salino sin apigenina (**panel B** derecho). Por tanto, la inserción del interposón  $\Omega$  en el gen *bgvA* de *R. tropici* CIAT899 no originó el mismo fenotipo que la inserción del transposón Tn5-Mob.

### 5.11. ESTUDIO PROTEÓMICO DE *R. tropici* CIAT899 Y DEL MUTANTE C9 EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO.-

Para caracterizar proteínas implicadas en la regulación de la expresión de los genes *nod* de *R. tropici* CIAT899 bajo estrés salino sin flavonoides se llevaron a cabo estudios proteómicos. El trabajo se realizó en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Federal de Paraná (Brasil), bajo la supervisión del Profesor Maltempo de Souza y de la Profesora Wassem. En primer lugar se analizó, mediante electroforesis bidimensional, el perfil de proteínas de CIAT899 en medio B<sup>-</sup>,

medio B<sup>-</sup> con apigenina y medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM, y se buscaron los “spots” con expresión diferencial en las distintas condiciones.

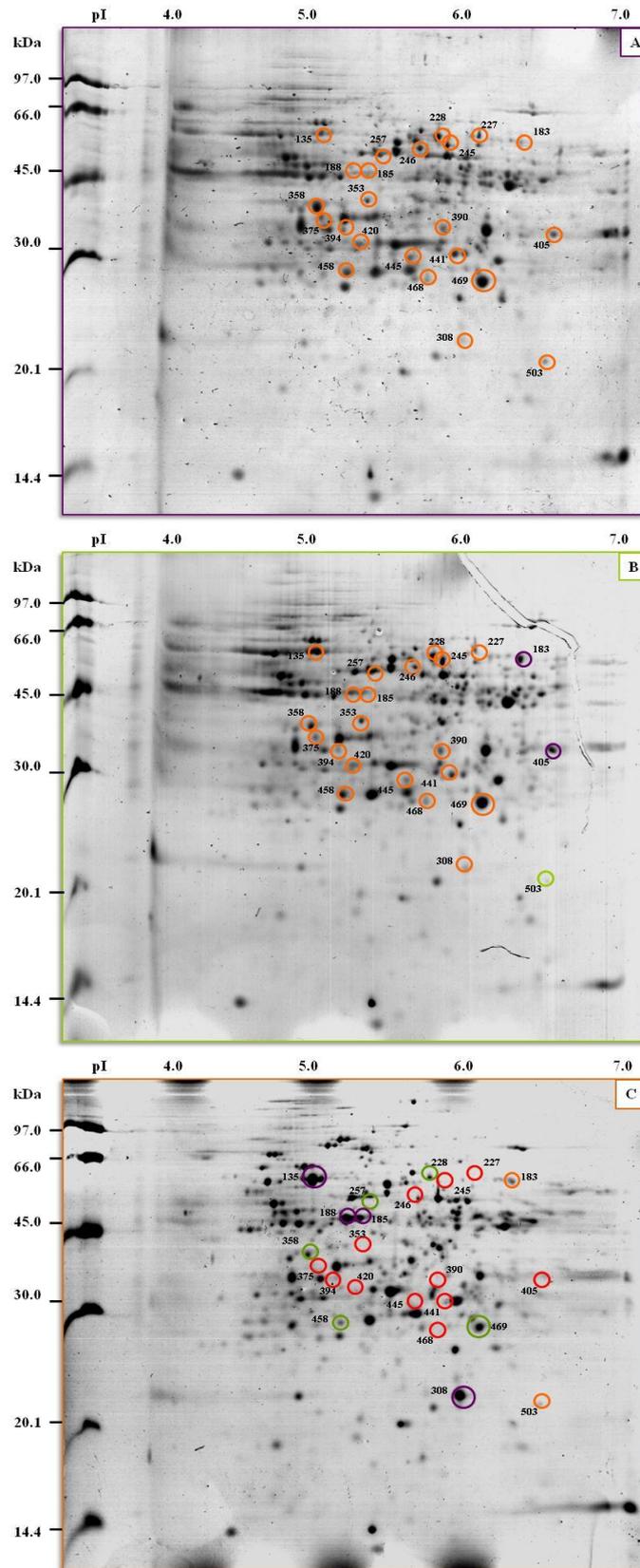


**Figura R82.-** Análisis mediante cromatografía en capa fina de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 y los mutantes C9 y SVQ689 en medio B<sup>-</sup> (panel izquierdo) y medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM (panel derecho). **Paneles A.-** CIAT899, **paneles B.-** C9, y **paneles C.-** SVQ689. Los carriles con signo positivo corresponden a los cultivos inducidos con 1 µg/mL de apigenina.

Las imágenes que se compararon tras la digitalización de los geles se muestran en la **Figura R83**. Se detectaron alrededor de 520 “spots” tanto en condiciones control (**panel A**) como con apigenina (**panel B**), y unos 380 con NaCl 300 mM (**panel C**). El patrón de proteínas obtenido fue similar en todas las condiciones; la mayoría de las proteínas se concentraron en el rango de pH de 4,5 - 6,5 y en el rango de masas moleculares de 28 kDa a 66 kDa, apareciendo pocas proteínas con una masa molecular inferior a 28 kDa.

Se detectó 1 proteína subexpresada (“spot” **503**) y 2 proteínas sobreexpresadas (“spots” **183** y **405**) en los cultivos crecidos con apigenina (**panel B**), una de las cuales no se expresó con NaCl 300 mM (“spot” **405**). Se detectaron 4 proteínas sobreexpresadas (“spots” **135**, **185**, **188** y **308**), 5 proteínas subexpresadas (“spots” **228**, **257**, **358**, **458** y **469**) y 12 proteínas ausentes (“spots” **227**, **245**, **246**, **353**, **375**, **390**, **394**, **405**, **420**, **441**, **445** y **468**) en condiciones de estrés salino (**panel C**), todas ellas con igual expresión en los cultivos crecidos con apigenina y en las condiciones control (**paneles B** y **A**, respectivamente). Todos estos “spots” de interés fueron extraídos de los geles y analizados mediante MALDI-TOF/TOF tras su digestión con tripsina.

## Resultados



**Figura R83.-** Perfil bidimensional de proteínas de *R. tropici* CIAT899 en medio B<sup>-</sup> (**panel A**), medio B<sup>-</sup> con apigenina (1 µg/mL) (**panel B**) y medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM (**panel C**). Las proteínas se extrajeron cuando los cultivos alcanzaron una D.O. a 600 nm de ~ 0,6. En cada condición se señalan los “spots” diferenciales, bien sobreexpresados (**color morado**), subexpresados (**color verde**) ó ausentes (**color rojo**) respecto al control (**color naranja**). pI: punto isoeléctrico.

Para identificar las distintas proteínas, los espectros obtenidos se compararon mediante la aplicación bioinformática MASCOT con la base de datos que contenía las proteínas de *R. tropici* CIAT899, cedida por el grupo de la Profesora Esperanza Martínez de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M) y descargada en el servidor del Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (L.N.L.S., Brasil). Dado que la base de datos nos fue cedida sin anotar, se recurrió a la aplicación bioinformática BLAST para buscar proteínas homólogas a las de *R. tropici* CIAT899, con el fin de averiguar su posible función.

En la **Tabla R19** se muestran las 11 proteínas que pudieron ser finalmente identificadas de esta forma. La gran mayoría de ellas no se expresaron en condiciones de estrés salino (“spots” **246, 353, 394, 405, 441 y 445** señalados en **color rojo** en la **Figura R83**), y los análisis realizados mediante BLAST las relacionaron en su mayor parte con proteínas implicadas en procesos de transporte o secreción a través de la membrana. Los “spots” **358, 458 y 469** se caracterizaron por su escasa expresión en condiciones de estrés salino (señaladas en **color verde** en la **Figura R83**), y los análisis realizados indicaron que guardan similitud de secuencia con proteínas periplásmicas y de transporte. Por último, los “spots” **135 y 308** se caracterizaron por estar sobreexpresados en condiciones de estrés salino frente a la condición control (marcados en **color morado** en la **Figura R83**). Los análisis bioinformáticos realizados relacionaron la función de estas dos últimas proteínas con diferentes mecanismos celulares de protección frente al estrés.

Por otra parte, se analizó de manera comparativa el perfil proteómico de CIAT899 y de C9 en medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM. La extracción se realizó cuando los cultivos alcanzaron una D.O. a 600 nm de ~ 0,5, momento en que se considera activada la expresión de los genes *nod* en *R. tropici* CIAT899 (Estévez, J. Tesis Doctoral, 2007). Se seleccionaron las proteínas que en condiciones de estrés salino sufrieron cambios de expresión o no se detectaron en el perfil del mutante C9 frente al perfil de la estirpe silvestre. En la **Figura R84** se observan los perfiles de proteínas obtenidos, y en la **Tabla R20** se muestran las distintas proteínas que pudieron ser identificadas.

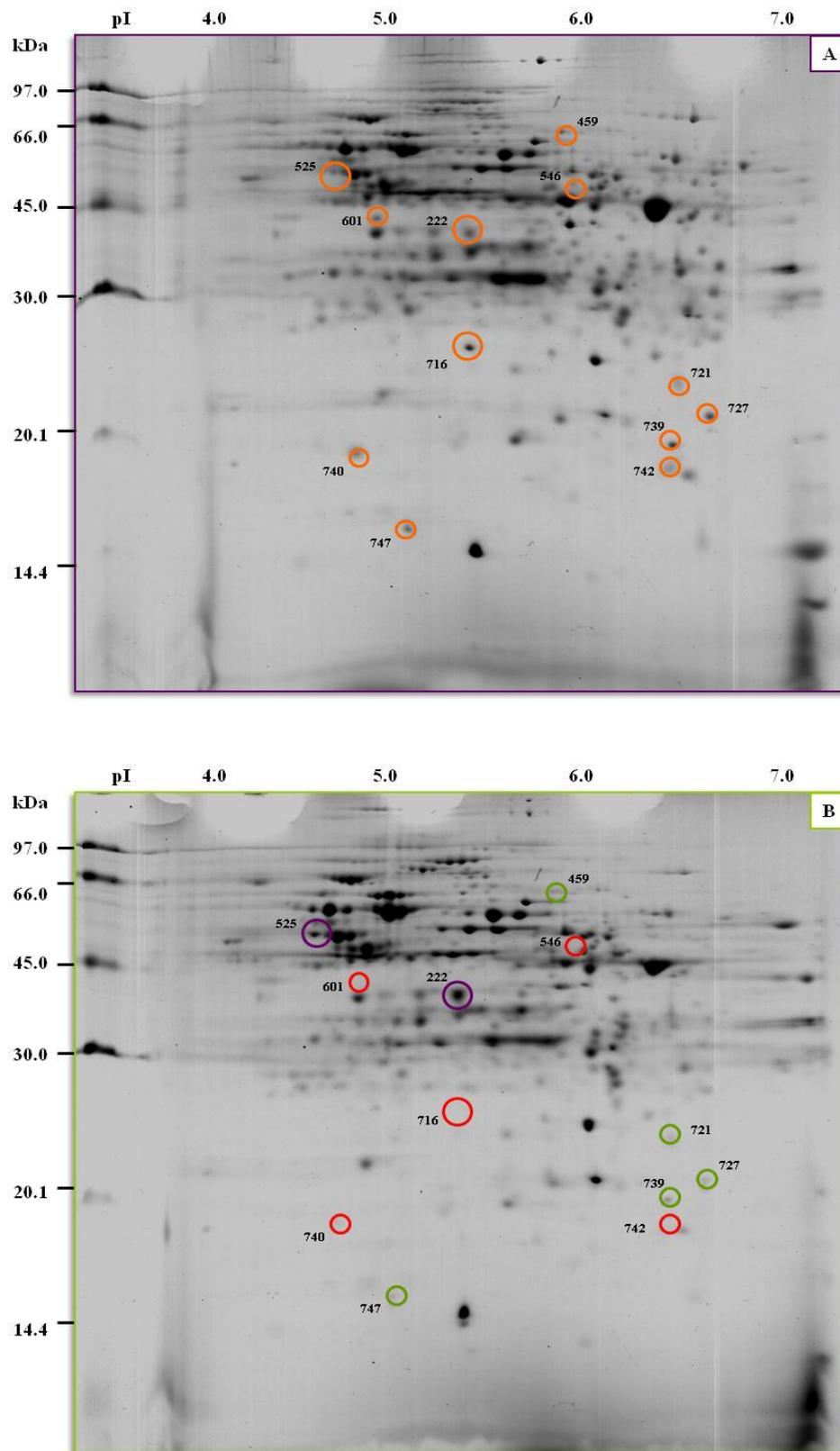
## Resultados

**Tabla R19.-** Identificación utilizando MALDI-MS/MS y MASCOT de algunas proteínas de *R. tropici* CIAT899 expresadas diferencialmente o ausentes en medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM respecto a medio B<sup>+</sup>.

“Spot”	Asignación	Mr (kDa)/ pI	Proteína homóloga
135 <sup>(a)</sup>	NT02RT0756	57.7 / 5.0	Chaperona GroEL [ <i>A. tumefaciens</i> C58, <i>A. radiobacter</i> K84, <i>R. leguminosarum</i> ]
246 <sup>(c)</sup>	NT02RTC0425	59.7 / 5.8	Transportador de dipéptidos tipo ABC [ <i>Agrobacterium radiobacter</i> K84]
308 <sup>(a)</sup>	NT02RT1014	22.4 / 5.8	Superoxidodismutasa [ <i>A. radiobacter</i> K84]
353 <sup>(c)</sup>	NT02RT2752	41.1 / 5.4	Proteína de secreción [ <i>A. radiobacter</i> K84]
358 <sup>(b)</sup>	NT02RTC0903	36.5 / 5.3	Proteína de unión periplásmica [ <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> ]
394 <sup>(c)</sup>	NT02RT1666	32.2 / 5.1	Factor de elongación de la traducción TS [ <i>A. radiobacter</i> K84]
405 <sup>(c)</sup>	NT02RT2287	38.3 / 6.1	Proteína metiltransferasa reguladora de la transcripción [ <i>A. radiobacter</i> K84]
441 <sup>(c)</sup>	NT02RTC0957	33.6 / 6.4	Transportador de aminoácidos tipo ABC [ <i>A. radiobacter</i> K84]
445 <sup>(c)</sup>	NT02RTC0949	34.7 / 6.6	Transportador de taurina tipo ABC, proteína de unión periplásmica [ <i>R. leguminosarum</i> ]
458 <sup>(b)</sup>	NT02RT2874	30.5 / 5.9	Transportador de aminoácidos tipo ABC [ <i>A. radiobacter</i> K84]
469 <sup>(b)</sup>	NT02RT3414	27.3 / 6.3	Transportador de aminoácidos tipo ABC [ <i>A. radiobacter</i> K84]

<sup>(a)</sup> Proteínas sobreexpresadas, <sup>(b)</sup> proteínas subexpresadas y <sup>(c)</sup> proteínas ausentes.

Como se puede apreciar en la **Figura R84**, en condiciones de estrés salino se detectaron unas 320 proteínas en CIAT899 y unas 300 en el mutante C9, y la mayoría de ellas se concentraron en el rango de pH de 4,5 – 6,5 y en el rango de masas moleculares de 28 kDa – 66 kDa, apareciendo muy pocas proteínas de pequeño tamaño. Se detectaron 12 “spots” con expresión diferencial en ambas bacterias; la mayoría de ellos estuvieron subexpresados (“spots” **459, 721, 727, 739 y 774**) o ausentes (“spots” **546, 601, 716, 742 y 740**) en el perfil del mutante C9 respecto a la estirpe silvestre, y sólo 2 estuvieron claramente sobreexpresados en el mutante C9 (“spots” **222 y 525**).



**Figura R84.-** Perfil bidimensional de proteínas de *R. tropici* CIAT899 (**panel A**) y del mutante C9 (**panel B**) en medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM. Las proteínas se extrajeron cuando los cultivos alcanzaron una D.O. a 600 nm de ~ 0,5. Se señalan los “spots” diferenciales, bien sobreexpresados (**color morado**), subexpresados (**color verde**) ó ausentes (**color rojo**) en el perfil del mutante C9 respecto al de CIAT899 (**color naranja**). pI: punto isoeléctrico.

## Resultados

Como se aprecia en la **Tabla R20**, los análisis realizados permitieron identificar 6 proteínas con diferente expresión en CIAT899 y C9 en medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM. En su mayor parte, estas proteínas fueron homólogas en secuencia a las correspondientes proteínas de *A. radiobacter* K84. Se identificaron dos proteínas con escasa expresión en el mutante C9 frente a la estirpe silvestre (“spots” **721** y **739**, señalados en **color verde** en la **Figura R84**), una de ellas homóloga a un factor de transcripción y otra a una enzima de la glucólisis. Otras dos de las proteínas identificadas fueron seleccionadas por estar sobreexpresadas en el perfil del mutante C9 (“spots” **222** y **525**, señalados en **color morado** en la **Figura R84**), y los análisis realizados indicaron que ambas están relacionadas con proteínas de membrana, implicadas en el transporte y en la síntesis de ATP. Por último, otras dos proteínas se caracterizaron por estar ausentes en el mutante C9 (“spots” **716** y **742**, señalados en **color rojo** en la **Figura R84**). Una de ellas muestra homología con la secuencia de una proteína hipotética de *A. radiobacter*, y la otra con proteínas chaperonas, importantes en la protección celular frente al estrés.

**Tabla R20.**- Identificación utilizando MALDI-MS/MS y MASCOT de algunas proteínas expresadas diferencialmente en el mutante C9 respecto a CIAT899 en medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM.

“Spot”	Asignación	Mr (kDa)/ pI	Proteína homóloga
<b>222</b> <sup>(a)</sup>	NT02RT2767	38.8 / 5.6	Transportador de aminoácidos tipo ABC [ <i>A. radiobacter</i> K84]
<b>525</b> <sup>(a)</sup>	NT02RT3710	50.4 / 4.9	Subunidad beta de la ATP sintasa F1 [ <i>A. radiobacter</i> K84]
<b>716</b> <sup>(c)</sup>	NT02RTC1351	23.9 / 5.9	Proteína hipotética <i>Arad_8513</i> [ <i>A. radiobacter</i> K84]
<b>721</b> <sup>(b)</sup>	NT02RT0150	23.2 / 5.9	Fosfoglicerato mutasa [ <i>A. radiobacter</i> K84]
<b>739</b> <sup>(b)</sup>	NT02RT1447	20.0 / 6.0	Factor de terminación/antiterminación de la transcripción NusG [ <i>A. radiobacter</i> K84]
<b>742</b> <sup>(c)</sup>	NT02RT3035	17.5 / 5.8	Pequeña chaperona molecular Hsp

<sup>(a)</sup> Proteínas sobreexpresadas, <sup>(b)</sup> proteínas subexpresadas y <sup>(c)</sup> proteínas ausentes.

## *Discusión*

---



La expresión de los genes de nodulación en los rizobios se produce a través de los reguladores transcripcionales de la familia LysR (NodD, entre otros), que son activados por los flavonoides presentes en los exudados de la planta (Megías *et al.*, 1993). No obstante, trabajos previos han demostrado que, cuando *R. tropici* CIAT899 crece bajo estrés salino sin apigenina, incrementa la cantidad y variedad de los factores Nod que produce, respecto a los producidos sin estrés (Estévez *et al.*, 2009). Se trata pues de un fenómeno de síntesis y secreción de los factores Nod que se induce bajo estrés salino y que, además, se hace independiente de la clásica regulación activada por el flavonoide apigenina a través de la proteína NodD1 (Estévez, J. Tesis Doctoral, 2007).

El incremento en la producción de los factores Nod observado en *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones de estrés salino podría ser una respuesta desarrollada por la bacteria para atenuar en lo posible los efectos adversos del estrés sobre el establecimiento de la simbiosis. También cabe la posibilidad de que se trate de una respuesta forzada por el empleo de condiciones de estudio excesivamente artificiales (Spaink, 2000). Ciertos autores postulan que algunos cambios que ocurren en la fisiología bacteriana bajo condiciones de estrés salino se deben a un fenómeno de choque osmótico. Sin embargo, los cambios que se observan en el perfil cromatográfico de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 bajo estrés salino no aparecen hasta transcurridas al menos 8 horas de incubación, tiempo que se considera excesivo para respuestas desarrolladas por un fenómeno de choque. Además, el efecto que la sal común ejerce sobre la producción de factores Nod en *R. tropici* CIAT899 es un efecto iónico más que osmótico, de naturaleza sodio-dependiente, por lo que debemos desestimar en un principio el choque osmótico como responsable de los cambios observados (Estévez, J. Tesis Doctoral, 2007). Por otra parte, Perret *et al.* (2000) indicaron que la cantidad de factores Nod sintetizados por una estirpe es un factor más en la determinación de su rango de hospedador. McIver *et al.* (1989) observaron que al mutar el gen *nodD* de *R. leguminosarum* bv. trifolii, se incrementó la expresión del gen *nodA* de forma totalmente independiente del flavonoide, lo que llevó a la extensión de su rango de hospedador a la no leguminosa *Parasponia*. En ausencia de flavonoide inductor, el NaCl deberá influir en algún mediador de naturaleza desconocida que active la expresión de los genes *nod* en CIAT899, obviando el papel del gen *nodD1*, principal regulador tradicional de este proceso.

Numerosos factores abióticos, como la elevada salinidad del entorno, pueden alterar diversos parámetros críticos, tanto de la leguminosa como del rizobio, afectando al diálogo molecular entre ambos y, consiguientemente, al desarrollo de la simbiosis (Graham, 1992). Por ello, es fundamental conocer la tolerancia de los simbiosistas a distintas condiciones medioambientales. *R. tropici* CIAT899 es una estirpe altamente tolerante a diversos tipos de estrés, lo que explica su empleo habitual como inoculante comercial de plantas de judía. Nuestros resultados indican que CIAT899 crece con elevadas concentraciones de NaCl (100, 200 y 300 mM), aumentando su tiempo de latencia y de generación a medida que aumenta la concentración de NaCl en el medio, y que la población bacteriana no experimenta un descenso significativo del número de células viables al crecer con NaCl 300 mM. Así pues, podemos decir que CIAT899 tolera y crece lentamente con NaCl debido, posiblemente, a la puesta en marcha de mecanismos de adaptación a la salinidad.

### 1. OBTENCIÓN Y SELECCIÓN DE MUTANTES AFECTADOS EN LA PRODUCCIÓN DE FACTORES NOD BAJO ESTRÉS SALINO.-

Para localizar los genes de *R. tropici* CIAT899 implicados en la ruta de regulación de los genes *nod* bajo estrés salino se mutagenizaron al azar, con el transposón Tn5-Mob (Reinhard Simon, 1984), las estirpes de *R. tropici* RSP3051 y CIAT899[pMP240]. Dado que RSP3051 presentó una elevada actividad  $\beta$ -galactosidasa basal en medio sólido (**Figura R2**), la selección de los transconjugantes se realizó, en este caso, cuantificando directamente su actividad en medio líquido en placas de microtítulo. Los clones seleccionados (Mut5, Mut7, Mut8 y Mut9) mostraron menor actividad  $\beta$ -galactosidasa con estrés salino que con apigenina (**Figura R5**), lo que sugiere que en ellos el transposón se ha insertado posiblemente en algún gen implicado en la expresión de los genes *nod* activada por el estrés salino.

Además, se siguió un segundo método de obtención de mutantes en el que se empleó como fondo genético la estirpe *R. tropici* CIAT899[pMP240]. La selección de los transconjugantes se realizó en medio sólido y, posteriormente, se cuantificó su actividad  $\beta$ -galactosidasa en medio líquido. Se obtuvieron varios mutantes que presentaron valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa inferiores con estrés salino que con apigenina, siendo Cp8 y Cp9 los más interesantes, por mostrar un descenso notable de actividad con NaCl (**Figura R6**). Los genes *nod* de Cp8 y Cp9 se inducen con apigenina, es decir, tienen activa la ruta de regulación mediada por flavonoides vía

NodD1, pero deben tener afectado algún intermediario/s implicado/s en la expresión de los genes *nod* con estrés salino. Los clones Cp1 y Cp7 mostraron un comportamiento diferente al resto. Ni la apigenina ni el estrés salino activaron la expresión de sus genes de nodulación, lo que podría deberse a la existencia de posibles mutaciones en genes claves del proceso de síntesis de los factores Nod o en el propio gen *lacZ*.

El análisis de la producción de factores Nod mediante cromatografía en capa fina de los 8 mutantes escogidos (Mut5, Mut7, Mut8, Mut9 y Cp1, Cp7, Cp8 y Cp9) permitió seleccionar sólo aquellos que efectivamente tuvieron afectada la producción bajo estrés salino sin inductor (**Figuras R7 y R8**). En presencia de apigenina, CIAT899 produce diferentes factores Nod que, mediante cromatografía en capa fina se separan en forma de bandas con diferente grado de hidrofobicidad (**Figuras R7 y R8, paneles A superiores**). En condiciones de estrés salino, este número de bandas se eleva, apareciendo bandas más marcadas y otras diferentes en la zona más hidrófoba de la placa, y el efecto se potencia aún más con NaCl y apigenina (**Figuras R7 y R8, paneles A inferiores**). De los 8 mutantes analizados, sólo Cp8 y Cp9 perdieron de forma parcial y total, respectivamente, la capacidad de producir factores Nod con NaCl 300 mM (**Figura R8, paneles D y E**, respectivamente), lo que sugirió la existencia en ellos de posibles mutaciones en genes esenciales del proceso de síntesis de los factores Nod.

Tras la curación del plásmido pMP240, el análisis del perfil de plásmidos mostró la ausencia del plásmido simbiótico (pSym) en el mutante Cp7 y su derivado C7 (**Figura R9, carriles 4 y 5**), por lo que ambos fueron descartados para estudios posteriores. Los mutantes Cp8 y Cp9 mantienen las características propias de la estirpe CIAT899 de la que derivan, como la secuencia del ARNr 16S. En ambos, y en sus derivados curados de pMP240, C8 y C9, se mantiene el plásmido simbiótico (**Figura R9, carriles 6, 7, 8 y 9**) y se amplificó el gen *nodD1* (**Figura R10, carriles 7, 8, 9 y 10**). Además, se comprobó que la curación del plásmido pMP240 no alteró el perfil de factores Nod de ninguno de ellos (**Figura R11**), por lo que, C8 y C9 se escogieron para ser estudiados en profundidad.

## 2. ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE C8.-

### 2.1. LOCALIZACIÓN DE LA INSERCIÓN.-

Tras verificar, mediante hibridación, que el mutante C8 presentaba una única inserción de Tn5-Mob (**Figura R12**), se rescató el fragmento *EcoRI-BamHI* que

contenía el gen de resistencia a la kanamicina del transposón y el fragmento del ADN genómico del mutante adyacente al punto de inserción. Los análisis bioinformáticos indicaron que la secuencia del fragmento de ADN rescatado tiene un 100% de similitud con la secuencia del gen *glnD* de *R. tropici* CIAT899 (número de acceso en GenBank U47030; O'Connell *et al.*, 1998).

### 2.2. CRECIMIENTO DEL MUTANTE C8.-

La proteína GlnD es una enzima bifuncional que desempeña un papel esencial en la asimilación y regulación del metabolismo del nitrógeno en la célula mediante la uridilación reversible de las proteínas P<sub>II</sub>. A menudo, los mutantes con defectos en la proteína GlnD tienen afectada la regulación de la respuesta al estrés de nitrógeno y no inducen las enzimas catabólicas necesarias para movilizar el nitrógeno en la célula (Patriarca *et al.*, 2002). Para determinar si la inserción de Tn5-Mob en el gen *glnD* afectaba al metabolismo de los compuestos nitrogenados en *R. tropici* CIAT899, se comparó el crecimiento de CIAT899 y de C8 en medio RMM con KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl y glutamina como únicas fuentes de nitrógeno.

Nuestros resultados indican que el mutante C8 crece utilizando las distintas fuentes de nitrógeno ensayadas, aunque más lentamente que CIAT899 con KNO<sub>3</sub> y con NH<sub>4</sub>Cl (**Figuras R18 y R19**). Especialmente destacable es la escasa velocidad de crecimiento de C8 en los medios con nitrato como única fuente de nitrógeno (**Figura R18 y Figura R19, panel A**). O'Connell *et al.* (1998) describieron que los mutantes en el extremo 5' del gen *glnD* de CIAT899 no crecen con nitrato como fuente de nitrógeno, pero no encontraron este efecto cuando las mutaciones se localizaban próximas al extremo 3'. En nuestro caso, la inserción del mutante C8 se localiza en la segunda mitad de *glnD* (**Figura R17**), en una zona que, sin embargo, parece afectar notablemente al comportamiento de la proteína GlnD. El hecho de que el mutante C8 carezca de actividad nitrato reductasa (**Apartado 4.2.1 de los Resultados**) sugiere la existencia de una relación entre el gen *glnD* y la asimilación del nitrato en *R. tropici* CIAT899, vía nitrato reductasa. La mutación de *glnD* también afecta al crecimiento de CIAT899 en medios con amonio, de modo que el mutante C8 crece más lentamente que la estirpe silvestre, aunque ambas alcanzan el mismo número de células viables, en estas condiciones (**Figura R19, panel B**). En cambio, la mutación de *glnD* no afecta al crecimiento con glutamina, ya que las curvas de crecimiento del mutante C8 y de

CIAT899, en medio RMM y medio B<sup>-</sup> con glutamina, fueron idénticas (**Figura R19, panel C y Figura R20**).

Cuando se estudió en profundidad el crecimiento del mutante C8 en medio B<sup>-</sup>, se puso de manifiesto la inestabilidad de la inserción en *glnD* cuando la única fuente de nitrógeno es el nitrato [Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y KNO<sub>3</sub>], fenómeno que no tuvo lugar cuando se añadió glutamina al medio de cultivo (**Apartado 4.2.2 de los Resultados**). Las colonias del mutante C8 presentan menor tamaño que las de CIAT899 con independencia de la fuente de nitrógeno utilizada; sin embargo, cuando el mutante C8 se cultivó durante más de 5 días en medio B<sup>-</sup> líquido y se aislaron colonias, se observó, junto a las características colonias pequeñas, la aparición de colonias de tamaño mayor, similares a las de CIAT899 (**Figura R21**). Los análisis mediante PCR indicaron que los clones de mayor tamaño carecían de la inserción en *glnD*, a pesar de que algunos conservaron la resistencia al antibiótico codificada por el transposón (**Figuras R22 y R23**). Cuando el medio B<sup>-</sup> líquido se suplementó con glutamina, el crecimiento del mutante C8 fue similar al de la estirpe silvestre (**Figura R20**), y todas las colonias que se aislaron del cultivo fueron de menor tamaño que CIAT899 y mantuvieron la inserción del transposón en *glnD* (**Figuras R24 y R25**). Todos estos datos apoyan la idea de que, en *R. tropici* CIAT899 se requiere el gen *glnD* para crecer con nitrato, de manera que, en presencia de las altas concentraciones de nitrato del medio B<sup>-</sup>, se seleccionan los revertientes espontáneos con pérdida de la mutación y, en ocasiones, el transposón se inserta en otros puntos del genoma (**Figura R28**). Sin embargo, este fenómeno no se observa cuando el medio, además de nitrato, contiene glutamina. La transferencia al mutante C8 de una copia silvestre del gen *glnD*, amplificado desde sus extremos con los cebadores GlnD-5 y GlnD-3, complementó el crecimiento del mutante C8 en medio B<sup>-</sup>. Resultados similares se obtuvieron cuando se transfirió un fragmento de mayor tamaño que, además de *glnD*, contenía unas 420 pb anteriores al gen (**Figura R52**). Estos resultados apoyan la implicación del gen *glnD* de *R. tropici* CIAT899 en la utilización del nitrato como fuente de nitrógeno en *R. tropici* CIAT899.

### 2.3. PRODUCCIÓN DE FACTORES NOD DEL MUTANTE C8.-

Mediante técnicas de HPLC-MS/MS se determinó la estructura de los factores Nod producidos por el mutante C8 en medio B<sup>-</sup>, medio B<sup>-</sup> con apigenina y medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM, y se compararon con los factores Nod producidos por CIAT899 en las

mismas condiciones, previamente analizados por nuestro grupo. Estas comparaciones se han recogido en la **Tabla III** del **Apéndice**.

En medio B<sup>-</sup> sin inductores CIAT899 produce 9 factores Nod y el mutante C8 sólo 4, todos comunes a los producidos por CIAT899. Con apigenina, CIAT899 produce 29 factores Nod diferentes y el mutante C8 sólo 11, de los que 6 son comunes a los producidos por CIAT899. Por otra parte, con NaCl 300 mM, CIAT899 produce 63 factores Nod y el mutante C8 produce sólo 6, pero todos ellos fueron también producidos por CIAT899. Para facilitar la comparación, en la **Tabla D1** se han resumido las principales características estructurales de los factores Nod sintetizados por CIAT899 y por C8 en medio B<sup>-</sup>. Como se puede observar, el mutante C8 produce factores Nod estructuralmente menos diversos que los producidos por la estirpe silvestre en las distintas condiciones estudiadas. En los factores Nod del mutante C8 se detecta una menor variedad de sustituyentes en el esqueleto oligosacárido y una menor diversidad en la longitud de los ácidos grasos que en los de CIAT899. En el mutante C8, los ácidos grasos carecen de grupos hidroxilos que, por el contrario, sí son frecuentes en los factores producidos por CIAT899. En resumen, la mutación en el gen *glnD* sí parece afectar a la naturaleza de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899, reduciendo su diversidad desde el punto de vista estructural.

La transferencia al mutante C8 del plásmido pMUS1068, portador de un fragmento de 3462 pb que contiene, además del gen *glnD*, unas 420 pb previas al gen, restauró la capacidad de producir factores Nod en medio B<sup>-</sup> con estrés salino (**Figura R53, paneles D**). Sin embargo, la transferencia al C8 del plásmido pMUS1050, portador de una copia silvestre de *glnD* bajo el control del promotor constitutivo del gen *lacZ*, no complementó la producción de factores Nod bajo estrés salino (**Figura R53, paneles C**). Estos resultados sugieren que la región previa del gen *glnD* es necesaria para que *R. tropici* CIAT899 produzca factores Nod bajo estrés salino sin flavonoide, y que, posiblemente, en ella se encuentren secuencias importantes para su regulación.

Los resultados del estudio de la influencia de la mutación en *glnD* sobre la expresión de los genes de nodulación y la consiguiente producción de factores Nod en medio RMM con nitrato, amonio y glutamina (**Figuras R30 y R29**, respectivamente) indicaron que la fuente de nitrógeno no afecta a la producción de factores Nod de *R. tropici* CIAT899 ni del mutante C8. Diversos autores proponen que el amonio reprime la inducción por flavonoides de la expresión de los genes *nod*, y que su actuación es

independiente de NtrC y de NifA (Baev *et al.*, 1992; Dusha & Kondorosi, 1993; Mendoza *et al.*, 1995; Wang & Stacey, 1990). Por el contrario, nuestros estudios indican que tanto con KNO<sub>3</sub>, como con NH<sub>4</sub>Cl o con glutamina, la apigenina induce la expresión de los genes *nod* y la producción de factores Nod sin diferencias significativas entre CIAT899 y C8 (**Figuras R30** y **R29**, respectivamente). Sin embargo, como se observa en estas figuras, el mutante C8 muestra una marcada reducción en la expresión de los genes *nod*, y en la producción de factores Nod, en medio RMM con NaCl 300 mM frente a CIAT899, independientemente de la fuente de nitrógeno utilizada. Esta reducción podría sugerir una cierta implicación del gen regulador *glnD* en el proceso de síntesis de los factores Nod activado por el estrés salino.

Además, tanto los ensayos de producción de los factores Nod, como los de actividad β-galactosidasa realizados en medio B<sup>-</sup> con glutamina como fuente adicional de nitrógeno (**Figuras R31** y **R32**, respectivamente), sugieren que la glutamina podría aumentar la producción basal de factores Nod en CIAT899 sin inductor. Sin embargo, la diversidad estructural de los factores Nod producidos por CIAT899 en las distintas condiciones no parece verse afectada con glutamina (**Tabla D1**), excepto en medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM, en el que se observa una disminución llamativa en el número de estructuras identificadas con glutamina. Así, en medio B<sup>-</sup> con glutamina y NaCl 300 mM CIAT899 produce 28 factores diferentes (**Tabla R8**) en tanto que, Estévez, J. en su Tesis Doctoral (2007) identificó 63 factores producidos por CIAT899 en B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM y sin glutamina (**Tabla II del Apéndice**). Estos factores están recogidos de forma comparativa en la **Tabla IV del Apéndice**. En general, las características estructurales de los factores Nod producidos por CIAT899 cuando se añade glutamina al medio B<sup>-</sup> son similares a las de la familia de factores producidos sin glutamina. El esqueleto de los factores producidos por CIAT899 con glutamina consta de 3, 4 ó 5 unidades de *N*- acetil-D-glucosamina, siendo los más frecuentes los de 4 y 5 unidades. Estos factores portan sustituyentes de los tipos 1, 2 y 3 fundamentalmente, siendo mayoritarios los del tipo 3, y contienen ácidos grasos mayoritariamente de 18 y de 16 carbonos, abundando los ácidos grasos saturados con apigenina y NaCl, y los ácidos grasos insaturados en ausencia de inductores. La hidroxilación es más frecuente en los ácidos grasos de los factores Nod producidos por CIAT899 sin glutamina.

Por otra parte, dado que la adición de glutamina permitió el crecimiento del mutante C8 en medio B<sup>-</sup> (**Figura R20**), y produjo una ligera mejora de la producción de factores Nod bajo estrés salino (**Figura R31**), se identificaron los factores Nod producidos por el mutante C8 en medio B<sup>-</sup> con glutamina, para comprobar si se recuperaba la producción de la estirpe silvestre en cuanto a diversidad estructural. Las comparaciones se recogen en la **Tabla V** del **Apéndice**. Los factores Nod IV(C<sub>16:0</sub>), IV(C<sub>18:1</sub>) y V(C<sub>18:1</sub>, NMe, S) fueron producidos tanto por el mutante C8 como por CIAT899 con glutamina en todas las condiciones analizadas. De los 8 factores Nod producidos por C8 en ausencia de inductores, 5 fueron producidos por CIAT899 en la misma condición. De los 20 factores Nod producidos por C8 con apigenina, 18 fueron producidos por CIAT899 en la misma condición. Y de los 17 factores Nod producidos por C8 con NaCl 300 mM, 15 fueron identificados también en CIAT899 con NaCl.

Como bien se aprecia en la **Tabla D1**, el mutante C8 produjo una menor diversidad estructural de factores Nod que CIAT899 con glutamina en todas las condiciones. Así, es de destacar una menor diversidad en la longitud de los esqueletos y de los ácidos grasos, así como en los tipos de sustituyentes de los factores Nod producidos por el mutante C8 respecto a los de CIAT899 en todas las condiciones. Igualmente destacable es la presencia de un menor porcentaje de ácidos grasos saturados, y la ausencia de ácidos grasos hidroxilados en los factores Nod producidos por C8 frente a los de CIAT899, también en todas las condiciones. Esto sugiere que la mutación en *glnD* afecta de alguna manera a la diversidad estructural de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 en medio B<sup>-</sup>. Al añadir glutamina al medio B<sup>-</sup>, aunque se recupera el crecimiento del mutante C8 (**Figura R20**), no se alcanza la diversidad de factores Nod de CIAT899. Es decir, la glutamina no corrige el defecto que la mutación de *glnD* provoca en la producción de factores Nod en *R. tropici* CIAT899.

La adición de glutamina al medio B<sup>-</sup> hace que CIAT899 produzca más factores Nod en ausencia de inductores (13 frente a 9 factores Nod), resultado que concuerda con lo observado en las cromatografías en capa fina de CIAT899 en medio B<sup>-</sup> (**Figura R11, panel B**) y medio B<sup>-</sup> con glutamina (**Figura R31, panel A izquierdo**). Sin embargo, el número de factores Nod producido por CIAT899 con NaCl 300 mM (63 factores Nod) sufre una reducción muy notable cuando se añade glutamina al medio de cultivo (28 factores Nod).

**Tabla D1.-** Características estructurales de las familias de factores Nod producidas por *R. tropici* CIAT899 y el mutante C8 en medio B<sup>-</sup> con y sin glutamina en condiciones control, con apigenina y con NaCl 300 mM.

		Control	Apigenina	NaCl 300 mM	
Medio B <sup>-</sup>	CIAT899	Número de estructuras	9 <sup>(d)</sup>	29 <sup>(b)</sup>	63 <sup>(c)</sup>
		Longitud de los esqueletos	III, IV, V	IV, V	II, III, IV, V
		Tipos de sustituyentes	1, 3, 8	1, 2, 3, 4, 6	1, 2, 3, 7
		Longitud del ácido graso	16C, 18C	10C, 12C, 14C, 16C, 18C, 20C, 22C	14C, 16C, 18C, 20C, 22C
		Ácidos grasos insaturados	78%	38%	46%
		Ácidos grasos hidroxilados	-	24%	9,5%
		C8	Número de estructuras	4 <sup>(a)</sup>	11 <sup>(a)</sup>
		Longitud de los esqueletos	III, IV, V	III, IV, V	IV, V
		Tipos de sustituyentes	1, 3	1, 2, 3, 8	1, 3
		Longitud del ácido graso	18C	16C, 18C	16C, 18C
		Ácidos grasos insaturados	100%	64%	50%
		Ácidos grasos hidroxilados	-	-	-
Medio B- con glutamina	CIAT899	Número de estructuras	13 <sup>(a)</sup>	26 <sup>(a)</sup>	28 <sup>(a)</sup>
		Longitud de los esqueletos	III, IV, V	III, IV, V	III, IV, V
		Tipos de sustituyentes	1, 2, 3	1, 2, 3, 8	1, 2, 3, 8
		Longitud del ácido graso	14C, 16C, 18C	14C, 16C, 18C, 20C	14C, 16C, 18C, 20C
		Ácidos grasos insaturados	69%	42%	50%
		Ácidos grasos hidroxilados	-	7%	-
		C8	Número de estructuras	8 <sup>(a)</sup>	20 <sup>(a)</sup>
		Longitud de los esqueletos	III, IV, V	III, IV, V	IV, V
		Tipos de sustituyentes	1, 2, 3	1, 2, 3	1, 2, 3
		Longitud del ácido graso	16C, 18C	14C, 16C, 18C	14C, 16C, 18C
		Ácidos grasos insaturados	62,5%	45%	59%
		Ácidos grasos hidroxilados	-	-	-

Fuentes: <sup>(a)</sup> Esta Tesis. <sup>(b)</sup> Estévez *et al.*, 2009. <sup>(c)</sup> Estévez, J. Tesis Doctoral, 2007. <sup>(d)</sup> Datos cedidos por el Profesor Manuel Megías.

En 1982, Hua *et al.* indicaron que los niveles intracelulares de glutamato se elevan considerablemente en *Rhizobium* sp. WR1001 a medida que aumenta la concentración de NaCl en el medio. Los autores señalan el probable papel de las enzimas GS (glutamina sintetasa) y GOGAT (glutamina-oxoglutarato aminotransferasa), encargadas de la asimilación del NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en los rizobios, en la

biosíntesis del glutamato durante el estrés salino. En el mismo sentido, Ricillo *et al.* (2000) indicaron que el glutatión, sintetizado a partir del glutamato, está implicado en las respuestas frente al estrés osmótico en *R. tropici* CIAT899, siendo esencial para el crecimiento de la bacteria en condiciones medioambientales adversas. Es probable que la glutamina guarde relación con el papel osmoprotector de otras moléculas, como el glutatión o el glutamato, con los que se encuentra metabólicamente relacionada. Esto podría explicar que la diversidad estructural de factores Nod producidos por CIAT899 con NaCl sea más alta en ausencia que en presencia de glutamina (63 frente a 28 factores Nod, respectivamente), debido al posible efecto osmoprotector.

### 2.4. LOS POLISACÁRIDOS SUPERFICIALES DEL MUTANTE C8.-

Como se observa en las **Figuras R36, R37 y R38**, CIAT899 produce EPS en medio B<sup>-</sup> y medio RMM con todas las fuentes de nitrógeno empleadas, tanto en líquido como en sólido, siendo mayor su producción con amonio. La cantidad de EPS producida por CIAT899 en medios con nitrato disminuye al aumentar la proporción nitrato:manitol que contenga el medio (**Figura R36**). El estrés salino (NaCl 300 mM) provoca una reducción significativa de la producción de EPS por CIAT899 en todos los medios, excepto cuando la única fuente de nitrógeno es el amonio. En cambio, el mutante C8 no produce cantidades detectables de EPS cuando la fuente de nitrógeno es el nitrato, posiblemente debido a su escaso crecimiento en estos medios. El mutante C8 produce menos EPS que CIAT899 con amonio y se comporta como el silvestre con glutamina. De igual forma que en la estirpe silvestre, en el mutante C8 la producción de EPS bajo estrés salino no se ve afectada con amonio pero se reduce drásticamente con glutamina. Por tanto, la mutación en *glnD* disminuye la producción de EPS, pero no tiene efecto en ausencia de estrés cuando la fuente de nitrógeno es la glutamina, lo que sugiere que la glutamina complementa el efecto de la mutación en la producción de EPS en ausencia de NaCl.

Se ha descrito que las deficiencias en el metabolismo del nitrógeno pueden provocar indirectamente alteraciones estructurales de otros componentes superficiales bacterianos como el lipopolisacárido (Sindhu *et al.*, 1990). Sin embargo, el mutante C8 mostró el mismo perfil electroforético de LPS y de KPS que CIAT899 incluso en condiciones de estrés salino (**Figuras R39 y R40**, respectivamente).

## 2.5. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DEL GEN *glnD*.-

Nuestros experimentos de RT-PCR cuantitativa indican que, con independencia de la fuente de nitrógeno empleada, la transcripción del gen *glnD* ocurre a bajos niveles en *R. tropici* CIAT899 ( $C_q \geq 38$ ). No obstante, los niveles de transcripción son superiores en los cultivos crecidos con  $KNO_3$  que en los crecidos con  $NH_4Cl$  o con glutamina (**Figura R41**), lo que sugiere que GlnD es necesaria para que CIAT899 crezca con nitrato como fuente de nitrógeno. Además, cuando *R. tropici* CIAT899 crece en medio B<sup>-</sup> con apigenina, con NaCl 300 mM o con ambos inductores de los genes *nod* a la vez, el gen *glnD* se expresa hasta 4 veces más que en ausencia de inductores de los genes *nod* (**Figura R42**). Estos resultados podrían indicar una posible relación entre el gen *glnD* y el proceso de síntesis de los factores Nod en *R. tropici* CIAT899.

Schlüter *et al.* (2000) estudiaron la expresión del gen *glnD* en *R. leguminosarum* bv. *viciae* VF39 mediante ensayos de actividad  $\beta$ -glucuronidasa y demostraron que, de modo similar a lo que ocurre en *E. coli*, en esta bacteria el gen *glnD* se expresa de forma constitutiva, con independencia de la fuente de nitrógeno empleada. Sin embargo, O'Connell *et al.* (1998) no detectaron expresión empleando la misma fusión transcripcional *glnD-gusA* en *R. tropici* CIAT899. Van Dommelen *et al.* (2002) cuantificaron la expresión de *glnD* empleando fusiones *pglnD-gusA* en *Azospirillum brasilense*. Sus resultados indicaron que, en términos generales, la expresión del gen *glnD* es reducida, aunque al emplear  $N_2$  observaron una expresión significativamente superior que al emplear  $NH_4Cl$  o aspartato como fuentes de nitrógeno. De igual manera, se ha demostrado que en *A. brasilense* el aumento de la expresión de *glnD* se produce en condiciones de fijación de nitrógeno (Van Dommelen *et al.*, 2002).

## 2.6. EFECTOS POLARES DE LA INSERCIÓN.-

En *R. tropici* CIAT899 el último codón codificante de aminoácidos y el codón STOP del gen *glnD* solapan con el codón de inicio de la transcripción del gen *mviN* (**Figura R17**), por lo que ambos genes pueden ser cotranscritos. Los experimentos de RT-PCR cuantitativa realizados indican que, de forma similar a lo que ocurre con el gen *glnD*, la transcripción del gen *mviN* en CIAT899 es en general baja ( $C_q \geq 38$ ) y significativamente mayor con  $KNO_3$  que con  $NH_4Cl$  o glutamina (**Figura R44**). Por otra parte, la inserción de Tn5-Mob en *glnD* parece afectar a la transcripción del gen

contiguo *mviN* con independencia de la fuente de nitrógeno empleada, lo que confirma la hipótesis de que ambos genes se cotranscriben.

Los estudios de O'Connell *et al.* (1998) indican que el gen *mviN* de *R. tropici* CIAT899 no está implicado en la nodulación ni en la fijación de nitrógeno, pero parece desempeñar alguna función en la movilidad de la bacteria. El análisis de la movilidad del mutante C8 indicó que la mutación en el gen *glnD* disminuye significativamente la movilidad de tipo “swimming” de *R. tropici* CIAT899 (**Figura R45**), lo que probablemente sea debido al efecto polar de la inserción sobre la transcripción de *mviN*. Son numerosos los trabajos que indican la existencia de efectos polares de la mutación de *glnD* sobre otros genes esenciales. Así, Graft & Ruby (2000) relacionaron el gen *glnD* con la producción de sideróforos en *Vibrio fischeri*. Además de esto, la presencia de un gen relacionado con la captación de  $Fe^{3+}$  en la región en la que se localiza el gen *glnD* en CIAT899 nos llevó a realizar el ensayo de detección de sideróforos en esta bacteria. Nuestros resultados indican que en *R. tropici* CIAT899 la producción de sideróforos no guarda relación alguna con el gen *glnD*.

Se ha sugerido que en condiciones de estrés abiótico los mecanismos de comunicación celular resultan esenciales para la supervivencia de las poblaciones bacterianas (Downie, 2010). Nuestros resultados indican que el estrés salino (NaCl 300 mM) aumenta la producción de moléculas autoinducidas en *R. tropici* CIAT899, y que la producción de AHL varía en función de la fuente de nitrógeno, siendo mayor cuando el medio contiene glutamina y menor cuando contiene  $KNO_3$  (**Figura R47**). Esto puede relacionarse con las óptimas condiciones de crecimiento que supone la presencia de la glutamina para *R. tropici* CIAT899, frente al nitrato y al amonio (**Figura R19**). Por otra parte, la mutación en *glnD* parece reducir la producción de autoinducidas con NaCl 300 mM, y no la afecta en ausencia de estrés, excepto con nitrato, condición en que el mutante C8 crece levemente.

### 2.7. FENOTIPO SIMBIÓTICO DEL MUTANTE C8.-

Puesto que las plantas de judía y de leucena no toleran concentraciones de NaCl superiores a 180 mM (Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2002), y que *R. tropici* CIAT899 no presenta el mismo fenotipo de producción de factores Nod con concentraciones de NaCl próximas a 180 mM que con NaCl 300 mM (Estévez, J. Tesis Doctoral, 2007), los ensayos con plantas se realizaron en ausencia de estrés salino.

Nuestros resultados muestran que la inserción de Tn5-Mob en la segunda mitad del gen *glnD* de *R. tropici* CIAT899 no afecta a la fijación de nitrógeno en plantas de judía ni de leucena (**Apartado 4.9.1** de los **Resultados**). Tanto las plantas inoculadas con el mutante C8 como las inoculadas con CIAT899 desarrollaron nódulos fijadores de nitrógeno en ambas plantas (**Tablas R12** y **R13**, respectivamente). Sin embargo, el número de nódulos desarrollados en las plantas de *P. vulgaris* inoculadas con el mutante C8 fue inferior al número de nódulos producido en las plantas inoculadas con CIAT899 (**Tabla R12**). Estos resultados coinciden con los descritos por otros autores, que afirman que los mutantes en *glnD* de *R. tropici* (O'Connell *et al.*, 1998), *R. leguminosarum* (Schlüter *et al.*, 2000) y *S. meliloti* (Yurgel & Kahn, 2008) muestran una capacidad fijadora de nitrógeno equivalente a la de la estirpe silvestre. No obstante, Yurgel & Kahn (2008) indicaron que, cuando se produce una delección en la primera parte del gen *glnD*, la interacción no es eficiente y el nitrógeno fijado no se cede a la planta o se cede en una forma en que éstas no pueden utilizarlo.

Los resultados obtenidos indican que la diversidad de factores Nod que produce el mutante C8, así como sus propiedades superficiales, permiten el establecimiento de una relación simbiótica eficaz en ausencia de competidores en la rizosfera. Los ensayos de competitividad en los que CIAT899 y el mutante C8 se coinocularon en proporción 1:1 indican que el mutante C8 es menos competitivo que CIAT899 en la ocupación de los nódulos de plantas de judía (**Figura R50**). La escasa movilidad tipo “swimming” que presentó el mutante C8 en relación a CIAT899 en placas de medio YM semisólido con agar al 0,3% (**Figura R45**) podría explicar su escasa competitividad frente a la estirpe silvestre.

Cuando se transfirió el plásmido pMUS1068, portador de una copia silvestre del gen *glnD* más unas 420 pb previas, al mutante C8, la estirpe C8[pMUS1068] fue igual de eficiente que CIAT899 en la nodulación (**Tabla R14**), y recuperó la capacidad competitiva en la ocupación de los nódulos de plantas de judía (**Figura R55**), lo que demuestra la importancia del gen *glnD* en la simbiosis de *R. tropici* CIAT899 con esta planta.

### 3. ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE C9.-

#### 3.1. LOCALIZACIÓN DE LA INSERCIÓN.-

Tras verificar, mediante hibridación, que el mutante C9 presentaba una única inserción de Tn5-Mob, se rescató el fragmento *EcoRI-BamHI* que contenía el gen de resistencia a la kanamicina del transposón y el fragmento del ADN genómico del mutante adyacente al punto de inserción. Los análisis bioinformáticos realizados indicaron que la secuencia rescatada tenía un 97% de similitud con el gen que codifica la proteína hipotética Arad\_9143 de *Agrobacterium radiobacter* K84. Al no disponer de la secuencia completa del genoma de *R. tropici* CIAT899, se dificultó en gran medida la localización genómica de esta secuencia. Sin embargo, gracias a la colaboración desinteresada del grupo de investigación de la Doctora Esperanza Martínez de la U.N.A.M., pudimos localizar la secuencia de este gen en el plásmido pRtCIAT899c o megaplásmido de *R. tropici* CIAT899 (**Figura R61**).

#### 3.2. CRECIMIENTO DEL MUTANTE C9.-

*R. tropici* CIAT899 tiene un tiempo de generación de 10 horas en medio mínimo B<sup>-</sup>, de 20 horas en medio B<sup>-</sup> con apigenina y de 24 horas en medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM (**Figura R62**). No obstante, los cultivos alcanzan el mismo orden de magnitud en el número final de células viables en las tres condiciones ( $10^9$  U.F.C./mL), lo que sugiere la gran versatilidad y capacidad de adaptación de esta bacteria a las condiciones ambientales.

Por su parte, el mutante C9 crece con mayor velocidad que CIAT899 en todas las condiciones, con un tiempo de generación de 8 horas en medio B<sup>-</sup>, y de 11 horas tanto en medio B<sup>-</sup> con apigenina como con NaCl 300 mM (**Figura R62**). El número de células viables alcanzado fue del mismo orden de magnitud que en la estirpe silvestre en todas las condiciones, lo que sugiere que la mutación en el gen *bgvA* altera de alguna manera el metabolismo de la bacteria, y repercute de forma importante en su capacidad de crecimiento y adaptación al medio.

#### 3.3. PRODUCCIÓN DE FACTORES NOD DEL MUTANTE C9.-

Los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa y las cromatografías en capa fina por las que el mutante C9 fue seleccionado (**Figuras R6, R8 y R11**), indican que la inserción del transposón impide la producción de factores Nod en condiciones de estrés salino sin apigenina. La determinación estructural de los factores Nod producidos por

C9 mediante técnicas de HPLC-MS/MS, y su comparación con la diversidad estructural de los factores producidos por CIAT899 en las mismas condiciones, previamente analizada por nuestro grupo (Estévez *et al.*, 2009), se ha recogido en la **Tabla VI** del **Apéndice**. En la **Tabla D2** se comparan, de forma resumida, las características estructurales de los factores Nod de CIAT899 y de C9, que sólo produce factores Nod con apigenina.

Se identificaron 9 factores Nod producidos por el mutante C9 con apigenina y 7 con apigenina y NaCl 300 mM, de los que sólo 6 fueron comunes (**Tabla VI** del **Apéndice**). En total, el mutante C9 sintetiza 10 factores Nod de composición estructural diferente. El factor V (C<sub>16:0</sub>) sólo fue identificado con apigenina y NaCl, los tetrámeros IV (C<sub>16:0</sub>, NMe), IV (C<sub>18:1</sub>) y IV (C<sub>18:1</sub>, NMe) sólo fueron identificados con apigenina, y el resto de los factores fueron identificados en ambas condiciones. El 60 % del total de factores Nod producidos por C9 están metilados en su extremo reductor. El 10% del total son moléculas sulfatadas, apareciendo el grupo sulfato únicamente como sustituyente en el factor Nod V(C<sub>18:1</sub>, NMe, S), producido por C9 en ambas condiciones. Los ácidos grasos son exclusivamente de 16 y de 18 carbonos, siendo los de 18 carbonos los más frecuentes en ambas condiciones.

En la **Tabla VI** del **Apéndice** vemos que, en condiciones de inducción con apigenina CIAT899 produce 29 factores Nod diferentes y el mutante C9 sólo 9, todos comunes a los producidos por CIAT899, salvo los factores Nod V (C<sub>16:0</sub>, NMe, dNAc), V (C<sub>18:1</sub>) y V (C<sub>18:1</sub>, NMe, dNAc), que fueron exclusivos del mutante C9 en esta condición. Por otra parte, en condiciones de estrés salino con apigenina CIAT899 produce 47 factores Nod y el mutante C9 produce sólo 7, 5 de los cuales son comunes a los producidos por CIAT899. En ambas condiciones fue exclusiva del mutante C9 la ausencia del grupo acetilo en las glucosaminas del esqueleto de los factores Nod V (C<sub>16:0</sub>, NMe) y V (C<sub>18:1</sub>, NMe). Si, de forma más general, comparamos las familias de factores Nod producidas por el mutante C9 y por CIAT899 (**Tabla D2**), en primer lugar llama la atención la menor diversidad estructural de los factores producidos por C9 en comparación con la estirpe silvestre. Incluso en medio B<sup>-</sup>, en el que CIAT899 produce bajos niveles basales de factores Nod, el mutante C9 no tiene producción. Como era de esperar, C9 tampoco produce factores Nod en medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM, ya que la selección del mutante se hizo en base a esa característica (**Figura R11**). En medio B<sup>-</sup> con apigenina, C9 produce tres veces menos factores Nod que CIAT899, y los factores

## Discusión

producidos tienen menos diversidad en cuanto a los sustituyentes del esqueleto oligosacárido, y a las características de los ácidos grasos, que son mayoritariamente insaturados, no hidroxilados, y con 16 ó 18 carbonos. En medio B<sup>-</sup> con apigenina y NaCl, ocurre un fenómeno similar; se observa una notable disminución en el número de factores Nod producidos por C9 (7 factores Nod) en comparación con CIAT899 (47 factores Nod). Además, los factores producidos por C9 con apigenina y NaCl están formados por un esqueleto de cinco unidades de *N*-acetil-D-glucosamina, en tanto que los de CIAT899 tienen cuatro o cinco unidades. De nuevo, los ácidos grasos de los factores Nod de C9 carecen de grupos hidroxilos, son mayoritariamente insaturados, y están formados por 16 ó 18 carbonos. Como se ve, las características estructurales de los factores producidos por C9 con apigenina y con apigenina y NaCl es muy similar. Estos resultados confirman que la apigenina induce la producción de factores Nod en el mutante C9, aunque con menor diversidad estructural que en la estirpe silvestre.

**Tabla D2.-** Características estructurales de las familias de factores Nod producidas por *R. tropici* CIAT899 y el mutante C9 en medio B<sup>-</sup> en condiciones control, con apigenina (Api), con NaCl 300 mM y con apigenina y NaCl 300 mM.

	Control	Apigenina	NaCl 300 mM	Apigenina y NaCl 300 mM	
CIAT899	Número de estructuras	9 <sup>(d)</sup>	29 <sup>(b)</sup>	63 <sup>(c)</sup>	47 <sup>(b)</sup>
	Longitud de los esqueletos *	III, IV, V	IV, V	II, III, IV, V	IV, V
	Tipos de sustituyentes	1, 3, 8	1, 2, 3, 4, 6	1, 2, 3, 7	1, 2, 3, 4, 5, 6
	Longitud del ácido graso	16C, 18C	10C, 12C, 14C, 16C, 18C, 20C, 22C	14C, 16C, 18C, 20C, 22C	12C, 14C, 16C, 18C, 20C, 22C
	Ácidos grasos insaturados	78%	38%	46%	34%
	Ácidos grasos hidroxilados	-	24%	9,5%	23%
	C9	Número de estructuras	- <sup>(a)</sup>	9 <sup>(a)</sup>	- <sup>(a)</sup>
Longitud de los esqueletos *		-	IV, V	-	V
Tipos de sustituyentes		-	1, 2, 3, 8	-	1, 2, 3, 8
Longitud del ácido graso		-	16C, 18C	-	16C, 18C
Ácidos grasos insaturados		-	67%	-	57%
Ácidos grasos hidroxilados		-	-	-	-

Fuentes: <sup>(a)</sup> Esta Tesis. <sup>(b)</sup> Estévez *et al.*, 2009. <sup>(c)</sup> Estévez, J. Tesis Doctoral. 2007. <sup>(d)</sup> Datos cedidos por el Profesor Manuel Megías.

### 3.4. LOS POLISACÁRIDOS SUPERFICIALES DEL MUTANTE C9.-

Cualquier cambio en la superficie de los rizobios puede suponer una alteración en el establecimiento de la simbiosis. El tamaño de las colonias del mutante C9 es menor que el de CIAT899 (**Figura R64**), y su mucosidad algo más oscura, tanto en ausencia como en presencia de inductores (**Figura R66**). La cuantificación del EPS producido en medio líquido indicó que el mutante C9 produce más EPS que CIAT899 tanto en medio B<sup>-</sup>, como en medio B<sup>-</sup> con apigenina y medio B<sup>-</sup> con NaCl 300 mM (**Figura R65**). Es decir, la mutación de *bgvA* estimula la producción de EPS, de forma especialmente llamativa en ausencia de inductores, lo que podría relacionarse con la región en la que se localiza la inserción. El gen *bgvA* se encuentra en una región que contiene genes implicados en la síntesis y secreción de polisacáridos superficiales (**Figura R61**). Sin embargo, la inserción del transposón Tn5-Mob en *bgvA* no afecta al perfil electroforético de LPS ni de KPS de *R. tropici* CIAT899 en ninguna de las condiciones estudiadas (**Figuras R67 y R68**, respectivamente).

### 3.5. EXPRESIÓN DE LOS GENES *nod* EN EL MUTANTE C9.-

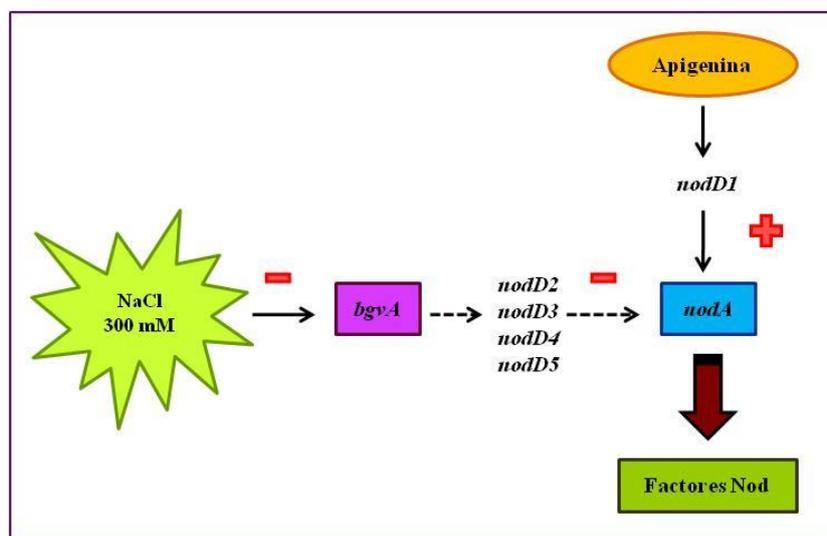
De acuerdo con las medidas de actividad  $\beta$ -galactosidasa realizadas durante la selección del mutante C9 sobre la fusión *pnodA::lacZ* del plásmido pMP240 (**Figura R6**), los ensayos de RT-PCR cuantitativa realizados muestran que el mutante C9 no presenta transcripción del gen *nodA* con estrés salino y ausencia de apigenina. En cambio, los niveles de expresión del gen *nodA* fueron similares en el mutante C9 y en CIAT899 con apigenina y con apigenina y NaCl 300 mM (**Figura R70**). Estos resultados apoyan la posible implicación del gen *bgvA* en la activación de la expresión del gen *nodA* y, por tanto, en la producción de factores Nod de *R. tropici* CIAT899 bajo estrés salino sin flavonoides, y sugieren la existencia de una vía alternativa de regulación de la expresión de los genes *nod* en estas condiciones, diferente a la clásica regulación por flavonoides. Además, los experimentos de RT-PCR cuantitativa en los que se investigó en qué medida los inductores de la expresión de los genes *nod* afectan a la expresión de *bgvA*, indicaron que su transcripción no se afecta con apigenina pero disminuye con NaCl 300 mM (**Figura R69**). En su conjunto, estos resultados indican que el gen *bgvA* podría actuar como un regulador negativo de la expresión del gen *nodA* pues su expresión está, a su vez, regulada negativamente por el estrés salino (NaCl 300 mM).

Se ha descrito que *R. tropici* CIAT899 posee 5 copias del gen *nodD* (van Rhijn *et al.*, 1993; Folch-Mallol *et al.*, 1996). Sería interesante determinar si alguno de ellos interviene en la producción de los factores Nod con NaCl 300 mM. Con los datos actuales resulta difícil dilucidar cuál o cuáles de las 5 copias de *nodD* podrían participar en este proceso. Los estudios realizados por Estévez, J. en su Tesis Doctoral (2007) demostraron que el gen *nodD1* no está implicado en la producción de factores Nod de *R. tropici* CIAT899 bajo estrés salino sin inductor, y que *nodD1* sólo interviene en la inducción de la ruta de síntesis activada por flavonoides (**Figura I15**). Además, estableció que el factor responsable de la inducción de los genes *nod* con NaCl se encuentra codificado en la región del pSym no presente en el cósmido pCV3804, que porta los genes *nodD1nodABCS* y parte de *nodU*, ni en el cósmido pCV38, que porta los genes *nodD1nodABCSUIJHPQ* (Estévez, J. Tesis Doctoral, 2007). Por otra parte, estudios recientes indican que el gen *nodD3* no induce la expresión del gen *nodA* del plásmido pMP240 en *R. tropici* RSP900[pMP240] bajo estrés salino sin inductor, lo que sugiere que NodD3 no debe participar en la activación de la ruta de producción de factores Nod inducida con NaCl 300 mM (van Brussel, A.A.N., comunicación personal). Es posible que alguna de las otras 3 copias del gen *nodD* pueda estar involucrada en la activación de la transcripción de los genes *nod* de *R. tropici* CIAT899 bajo estrés salino. El gen *nodD2* se ha descrito como represor de la expresión de los genes *nod* en diversas estirpes de rizobios (Fellay *et al.*, 1998; Machado & Krishnan, 2003), por lo que podría ser uno de los genes involucrados en la regulación de la expresión de *nodA* bajo estrés salino. En la **Figura D1** se muestra un esquema del posible funcionamiento de la ruta alternativa de regulación dependiente del estrés salino. En ausencia de NaCl, BgvA impediría la expresión del gen *nodA* a través de la vía alternativa. Con NaCl 300 mM, se reprime la expresión de *bgvA* y, en consecuencia, aumentaría la expresión de *nodA*, incluso en ausencia de flavonoides.

### 3.6. FENOTIPO SIMBIÓTICO DEL MUTANTE C9.-

Los resultados obtenidos en los ensayos de nodulación indican el mutante C9 tiene alterado el comportamiento simbiótico en plantas de judía y de leucena, de modo que nodula menos eficazmente que CIAT899 en ambos casos (**Apartado 5.8.1** de los **Resultados**). En las plantas de judía, que desarrollan nódulos de tipo determinado, el número y la masa nodular son significativamente menores en las plantas inoculadas con el mutante C9 que en las inoculadas con CIAT899 (**Tabla R17**). En las plantas de

leucena, que desarrollan nódulos de tipo indeterminado, las diferencias entre mutante y silvestre se apreciaron únicamente en la masa seca de la parte aérea de las plantas (Tabla R18). La alteración de las propiedades simbióticas del mutante C9 respecto a la estirpe silvestre se podría deber a la escasa diversidad de factores Nod que produce (Tabla D2). Sin embargo, el mutante C9 es más competitivo que CIAT899 en plantas de judía, ocupando el 89 % de los nódulos al ser coinoculado con ella (Figura R74). Además, como se muestra en la misma Figura R74, las plantas coinoculadas tienen pequeño tamaño y un color verde-amarillento similar al de las plantas inoculadas con el mutante C9 en los ensayos de nodulación (Figura R72), lo que indicaría que la fijación del nitrógeno o su transferencia a la planta no resulta eficaz.



**Figura D1.-** Hipotético papel del gen *bgvA* en la ruta de regulación de la síntesis de factores Nod activada en *R. tropici* CIAT899 por el estrés salino. Los signos positivo y negativo indican inducción y represión de la expresión génica, respectivamente. Las flechas discontinuas indican relaciones aún no demostradas.

La observación de la colonización de las raíces al microscopio confocal indicó que el mutante C9 se adhiere en mayor proporción a las raíces de judía que CIAT899 cuando ambas estirpes son coinoculadas (Figura R75). Los polisacáridos de superficie y adhesinas rizobianas juegan un papel esencial en la colonización de la raíz, al ser requeridas para la adhesión de la bacteria a los pelos radicales (Elías *et al.*, 2009). En este sentido, Milner *et al.* (1992) describieron mutantes de *R. tropici* CIAT899 deficientes en la producción de EPS que eran menos competitivos que la estirpe silvestre en plantas de judía, indicando que en esta bacteria el EPS no es necesario para nodular pero contribuye a la capacidad competitiva en plantas de judía. Posiblemente, la mayor producción de EPS del mutante C9 y su mayor velocidad de crecimiento frente a

CIAT899, podrían explicar su mayor capacidad competitiva en la ocupación de los nódulos en plantas de judía.

Los análisis de producción de AHL realizados indican, como ya se ha comentado, que el NaCl 300 mM aumenta la producción de AHL en *R. tropici* CIAT899. Además, el mutante C9 produce más autoinductores que CIAT899 (**Figura R71**), lo que podría explicar su mayor capacidad para colonizar la raíz de las plantas de judía. Pérez-montaña *et al.* (2011) han demostrado que en *S. fredii* SMH12, *R. etli* ISP42 y *R. sultae* IS123, la producción de AHL se incrementa en presencia de los flavonoides inductores de los genes de nodulación. Es posible que el NaCl, como inductor de los genes *nod* de *R. tropici* CIAT899, determine también un aumento en la producción de autoinductores en esta bacteria.

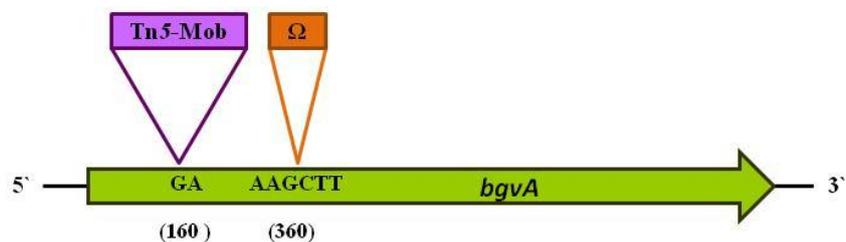
### 3.7. COMPLEMENTACIÓN Y GENERACIÓN DEL MUTANTE DE FORMA DIRIGIDA.-

La transferencia del plásmido pMUS1066, portador de una copia silvestre del gen *bgvA* (**Figura R76**), no complementó la producción de factores Nod del mutante C9 en condiciones de estrés salino sin flavonoide (**Figura R77, paneles D**). Puesto que el vector empleado es portador del promotor del gen *lacZ*, y el gen *bgvA* fue clonado, con cebadores externos en su mismo sentido de transcripción, los resultados indican que el fragmento de ADN inserto en pMUS1066 no es el responsable directo de la ausencia de producción de factores Nod bajo estrés salino sin inductor. Por ello, se investigó si el fragmento de ADN portador de los cuatro genes que integran el hipotético operón al que pertenece el gen *bgvA* junto a su posible zona promotora, complementaba la producción de factores Nod con estrés salino sin inductor. Con la transferencia al mutante C9 del plásmido pMUS1067, derivado de pBBR1MCS-5 con los genes del hipotético operón al que pertenece el gen *bgvA* (**Figura R78**), tampoco se complementó la producción de factores Nod bajo estrés salino sin inductor (**Figura R79, paneles D**). Estos resultados sugieren que otros genes no presentes en el inserto de pMUS1067, deben estar implicados en la regulación de la producción de factores Nod bajo estrés salino.

Dado que no se pudo complementar al mutante C9, se recurrió a interrumpir el gen *bgvA* de forma dirigida mediante la inserción del interposón  $\Omega$  (**Figura R80**). El perfil de producción de factores Nod del mutante generado, SVQ689 (*R. tropici* CIAT899 *bgvA::\Omega*), es similar al perfil de CIAT899 en todas las condiciones analizadas (**Figura R82**). Además, el crecimiento del mutante SVQ689 no difiere del de CIAT899

en ninguna de las condiciones estudiadas. Estos resultados indican que la mutación de *bgvA* por inserción de  $\Omega$  no origina el mismo fenotipo que la inserción de Tn5-Mob.

El punto de inserción del transposón Tn5-Mob en el gen *bgvA* se localiza a 160 pb del extremo 5' del gen, y el punto en el que se ha insertado  $\Omega$  se localiza a unas 200 pb por detrás de él, en el sentido de la transcripción de *bgvA* (**Figura D2**). En este contexto, nuestros resultados podrían deberse a que la primera zona de la secuencia de *bgvA*, en la que está inserto el transposón Tn5-Mob, fuera la encargada de regular la producción de factores Nod en respuesta al estrés salino. Siguiendo esta hipótesis, en el mutante C9 BgvA no podría regular correctamente la expresión de los genes *nod* bajo estrés salino, y en el mutante SVQ689 se generaría una proteína BgvA truncada, pues el interposón  $\Omega$  contiene secuencias terminadoras de la transcripción, y se mantendrían las funciones de la proteína silvestre relacionadas con la regulación de los genes *nod* bajo estrés salino. Este hecho podría explicar los diferentes fenotipos observados en el mutante C9 y en el mutante SVQ689, pero no explicaría la no complementación por transferencia al mutante C9 de los plásmidos pMUS1066 y pMUS1067.



**Figura D2.-** Localización de las inserciones de Tn5-Mob y del interposón  $\Omega$  en la secuencia del gen *bgvA* de *R. tropici* CIAT899. Entre paréntesis se indica en pb la situación de los nucleótidos entre los cuales ocurrió la inserción al azar de Tn5-Mob y la situación de la diana *Hind*III en la que se ha insertado  $\Omega$ .

En ocasiones, la actividad asociada a la inserción del transposón Tn5-Mob puede producir deleciones o reorganizaciones en zonas no necesariamente próximas a la inserción (Jilk *et al.*, 1993). Por ello, para explicar los resultados obtenidos igualmente habría que pensar en efectos polares (hacia arriba o hacia abajo) muy específicos del transposón insertado en *bgvA* sobre otros genes de CIAT899. Quizás la presencia del transposón dificulte el correcto plegamiento de la proteína afectando a su función. Otra posible explicación sería la existencia de alguna mutación espontánea no detectada que pudiera haber ocurrido en el mutante C9 y que explicase los cambios observados.

### 3.8. ANÁLISIS PROTEÓMICO EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO.-

A pesar de sus limitaciones, como su difícil reproducibilidad y su laboriosidad, la aproximación proteómica se ha empleado para estudiar el patrón de expresión de proteínas de diversas especies de rizobios como *R. leguminosarum*, *R. etli* y *S. meliloti* en muy distintas condiciones (Guerreiro *et al.*, 1997, 1999; Encarnación *et al.*, 2003). Las modificaciones post-transcripcionales, que ocurren durante el crecimiento y desarrollo de los organismos, no se pueden deducir del estudio de las secuencias genómicas y/o abundancia de transcritos (Thurston *et al.*, 2005). Sin embargo, los estudios proteómicos permiten el análisis de tales modificaciones. Hemos empleado una aproximación proteómica para caracterizar genes implicados en la regulación de la producción de factores Nod que se activa en *R. tropici* CIAT899 con estrés salino sin inductor. Mediante geles bidimensionales teñidos con Coomassie, se visualizaron y seleccionaron, para su identificación, las proteínas de *R. tropici* CIAT899 con diferente nivel de expresión en medio B<sup>-</sup> con apigenina y con NaCl 300 mM, respecto a las condiciones control (**Figura R83**). La presencia de elevadas cantidades de EPS en las muestras dificultó en principio la separación de las proteínas durante el IEF, provocando la existencia de un rayado o “streaking” horizontal en los geles. La resolución se mejoró aumentando el número de lavados y el número de ciclos de sonicación de las muestras antes de su procesamiento. Tras su selección y digestión con tripsina, los “spots” de interés se analizaron por Espectrometría de Masas. Los espectros obtenidos mediante MALDI se contrastaron, empleando la aplicación bioinformática MASCOT, frente a la base de datos, que contenía las proteínas de *R. tropici* CIAT899 sin anotar, depositada en el servidor del L.N.L.S. (Brasil). Los análisis bioinformáticos mediante BLAST permitieron asignar una función a las distintas proteínas (**Tabla R19**).

Se han identificado 3 proteínas de CIAT899 con escasa expresión en estrés salino respecto a las condiciones control, que guardan similitud de secuencia con proteínas periplásmicas y sistemas de transporte de aminoácidos tipo ABC (“spots” 358, 458 y 469). El factor de elongación TS (“spot” 394) y la proteína metiltransferasa reguladora de la transcripción (“spot” 405) no se expresan en CIAT899 con estrés salino, lo que sugiere que la traducción de algunas proteínas está afectada durante el crecimiento con NaCl 300 mM. Otras 4 proteínas, relacionadas mayoritariamente con proteínas implicadas en procesos de transporte o secreción a través de la membrana, no se expresan en CIAT899 con estrés salino (“spots” 246, 353, 441 y 445). Estos

resultados sugieren la existencia de una menor disponibilidad de transportadores de membrana bajo estrés salino. Posiblemente, las modificaciones que ocurren a nivel de la membrana son importantes para hacer frente a las condiciones externas. Los trabajos de Poolman *et al.* (2004) y Fox *et al.* (2006) avalan igualmente la teoría de los cambios en los sistemas de transporte bacterianos por acción del estrés medioambiental.

Por otra parte, numerosos trabajos indican que cuando las bacterias encuentran condiciones medioambientales adversas como calor, metales pesados, salinidad y limitación de nutrientes, el nivel de expresión génica se incrementa considerablemente. Así, en respuesta al estrés osmótico por altas concentraciones de NaCl las bacterias inician un programa de expresión que se manifiesta con una mayor producción de proteínas de respuesta al estrés (Nystrom, 1998). En nuestro trabajo se han identificado 2 proteínas que se sobreexpresan cuando *R. tropici* CIAT899 crece en condiciones de estrés salino respecto a cuando crece en ausencia de inductor, la chaperona GroEL (“spot” 135) y la superoxidodismutasa (“spot” 308). Ambas tienen relación funcional con diferentes mecanismos celulares de protección frente al estrés, lo que sugiere que su expresión se induce con NaCl 300 mM, lo que favorecería la capacidad adaptativa de CIAT899 en estas condiciones. Del mismo modo, en *S. meliloti* y *R. leguminosarum* se han descrito chaperonas inducibles por el estrés salino, las proteínas GroEL, que favorecen la unión de la proteína NodD al ADN bacteriano (Bittner *et al.*, 2007; Gould *et al.*, 2007). De esta forma se podría explicar que la expresión de los genes *nod* se incrementa en *R. tropici* CIAT899 en condiciones de estrés salino sin inductor a través de algunas de las proteínas *nodD*. Los genes reguladores responden a señales específicas que inducen o inhiben la transcripción, traducción o algún otro evento involucrado en la expresión génica, modificándose adecuadamente la síntesis de productos génicos. A pesar de ser homóloga en secuencia a una proteína hipotética en *A. radiobacter*, los análisis bioinformáticos indican que no existen dominios proteicos funcionales conservados en la secuencia del gen *bgvA* de *R. tropici* CIAT899. Por ello resulta difícil dilucidar su mecanismo de actuación. Numerosos reguladores generales y factores sigma ( $\sigma$ ) alternativos están involucrados en la respuesta de las bacterias al estrés abiótico. En *E. coli* se ha descrito como, bajo condiciones de estrés, los factores  $\sigma$  se unen a la ARN polimerasa y permiten la transcripción de los genes, de forma que la respuesta frente al estímulo medioambiental es relativamente rápida puesto que no se precisa una síntesis de novo de dichos factores (Ades, 2004). Mitsui *et al.* (2004)

describieron igualmente un factor del grupo  $\sigma^{32}$  (RpoH1) en *S. meliloti*, que era imprescindible para la formación de nódulos efectivos en alfalfa así como para proteger a la bacteria del estrés medioambiental. Es posible también que el factor molecular inductor de la expresión de los genes *nod* en presencia de NaCl pertenezca a esta familia de reguladores. Igualmente existen pequeños ARN no codificantes (sRNA) en las bacterias que actúan, a nivel transcripcional y post-transcripcional, como elementos reguladores cruciales en las respuestas bacterianas al estrés. Es probable que la mayoría de esos transcritos tengan una función reguladora que implique el apareamiento de los mismos con secuencias complementarias en el ARNm diana (Gottesman, 2005; Schlüter *et al.*, 2010). Este tipo de factores podrían estar implicados en la regulación de la biosíntesis y transporte de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 bajo estrés salino. Sin embargo, el análisis de la secuencia nucleotídica del gen *bgvA* y de la región en la que se localiza, indican que no hay ningún sRNA obvio en esa zona, pues no existen ni promotores ni terminadores de transcripción claros típicos de un gen sRNA. Por otra parte, tampoco se detecta conservación de la secuencia a nivel nucleotídico con los sRNA de  $\alpha$ -proteobacterias. La homología de *bgvA* sólo se detecta, tanto a nivel de proteína como de DNA, con el loci *arad\_9143* de *A. radiobacter*. Experimentos de Northern y/o “primer extension” permitirían conocer lo que realmente se transcribe en esta región y descartar el posible papel de los sRNA como reguladores de este proceso (Jiménez-Zurdo, J.I., comunicación personal).

La producción de factores Nod de *R. tropici* CIAT899 bajo estrés salino parece obedecer a mecanismos moleculares estrictamente regulados y no a una mera desregulación del metabolismo celular en condiciones estresantes. Desde este punto de vista, el incremento de factores Nod bajo estrés salino podría ir encaminado a la ampliación del rango de hospedador de la bacteria, buscando mejores condiciones osmóticas en el interior de plantas resistentes a dichas condiciones de estrés.

El trabajo proteómico realizado nos ha permitido identificar también 6 proteínas de *R. tropici* CIAT899 cuya expresión se ve afectada bajo estrés salino por la mutación en *bgvA* (**Tabla R20**). De modo similar a lo que ocurrió con la identificación del gen *bgvA*, homólogo al gen *arad\_9143* de *A. radiobacter* K84, la mayoría de las proteínas identificadas son similares en secuencia a las correspondientes en *A. radiobacter* K84. Esto aporta mayor fiabilidad a los resultados obtenidos dado que se trata de especies filogenéticamente relacionadas (Lloret & Martínez-Romero, 2005). Ninguna de las

proteínas identificadas guarda una clara relación con la maquinaria de producción de los factores Nod clásica. Además, ninguna de ellas es codificada por el gen *bgvA* ni por genes próximos de la región a la que éste pertenece. A pesar de que el análisis proteómico posee un alto poder de resolución y sensibilidad, existen ciertas limitaciones a tener en cuenta (Wilkins, 2009; Musarrat *et al.*, 2010). En ocasiones la incapacidad de detectar algunas proteínas puede indicar que estas están presentes en cantidades relativamente bajas, no son solubles, migran con proteínas mucho más abundantes que ellas o poseen masas moleculares demasiado pequeñas y no se pueden separar en la segunda dimensión (LaBaer & Ramachandran, 2005). No obstante, nuestros resultados indican que la mutación de *bgvA* impide la expresión de una proteína homóloga a la proteína hipotética Arad\_8513 de *A. radiobacter* K84 (“spot” 716), que aún no ha sido estudiada. Igualmente, se detecta la ausencia, en el mutante C9, de pequeñas chaperonas moleculares (“spot” 742) lo que podría sugerir la ausencia de ciertos mecanismos de protección frente al estrés por NaCl 300 mM cuando el gen *bgvA* está mutado. También se detecta una reducción significativa en la expresión del factor de terminación/antiterminación de la transcripción NusG (“spot” 739) en el mutante C9, lo que podría indicar cambios en la expresión de numerosos genes dependientes de él. Además, los resultados indican que en el mutante C9 se incrementa la expresión de transportadores tipo ABC (“spot” 222) y de la subunidad  $\beta$  de la ATP sintasa (“spot” 525) en relación a CIAT899, lo que sugiere que bajo estrés salino cierta actividad metabólica del mutante C9 podría ser superior a la de CIAT899, suponiéndole una ventaja para crecer en estas condiciones de estrés.

Por otra parte, la identificación realizada está basada únicamente en la similitud de las secuencias. No hemos demostrado que el producto de los genes identificados tenga actividad en *R. tropici* CIAT899. En todo caso, para demostrar que la mutación en el gen *bgvA* es responsable de los cambios detectados en el perfil de proteínas de *R. tropici* CIAT899 bajo estrés salino, sería necesario comprobar mediante otras técnicas (RT-PCR cuantitativa, por ejemplo) el nivel de expresión de los distintos genes que codifican las proteínas identificadas en la estirpe silvestre, y confirmar su cambio de expresión en la estirpe mutante C9. No obstante, estas comprobaciones no determinarían el tipo de relación, directa o indirecta, que guarda del gen *bgvA* con cada uno de ellos.



## *Conclusiones*

---



1. El gen *glnD* está implicado en el crecimiento de *R. tropici* CIAT899 con distintas fuentes de nitrógeno. La inserción del transposón Tn5-Mob en la segunda mitad del gen impide el crecimiento en medios con nitrato como única fuente de nitrógeno, lo disminuye en medios con amonio y no lo afecta en medios con glutamina. Además, esta inserción es inestable en medio mínimo B<sup>-</sup>.
2. La producción de EPS de *R. tropici* CIAT899 depende de la fuente de nitrógeno utilizada para el crecimiento de la bacteria, y se reduce con NaCl 300 mM, excepto cuando el medio contiene NH<sub>4</sub>Cl como única fuente de nitrógeno. El gen *glnD* está implicado en este proceso.
3. El gen *glnD* no es esencial para el establecimiento de una simbiosis efectiva entre *R. tropici* CIAT899 y sus hospedadores habituales, judía y leucena. Sin embargo, el gen *glnD* está implicado en la capacidad competitiva de *R. tropici* CIAT899 por la ocupación de los nódulos en plantas de judía.
4. El mutante C8 produce menor diversidad estructural de factores Nod que la estirpe silvestre, especialmente en condiciones de estrés salino (NaCl 300 mM).
5. La glutamina aumenta la producción de factores Nod en *R. tropici* CIAT899 en ausencia de inductores de los genes de nodulación, y reduce su diversidad estructural con NaCl 300 mM.
6. El gen *mviN*, que en *R. tropici* CIAT899 se localiza a continuación del gen *glnD*, muestra su mismo patrón de expresión y se cotranscribe con él. El gen *mviN* está implicado en la movilidad de tipo “swimming” de *R. tropici* CIAT899.
7. El mutante C9, que tiene el transposón Tn5-Mob inserto en el nuevo gen *bgvA*, no expresa el gen *nodA* bajo estrés salino sin flavonoide y no produce factores Nod en estas condiciones. Sin embargo, el gen *bgvA* de *R. tropici* CIAT899 no es el responsable directo de la producción de factores Nod bajo estrés salino sin flavonoides.
8. El estrés salino (NaCl 300 mM), inductor de los genes *nod* en *R. tropici* CIAT899, incrementa la producción de moléculas implicadas en la percepción del quórum en esta bacteria.



## ***Bibliografía***

---



- Acosta-Durán, C. & E. Martínez-Romero.** 2002. Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. *Arch. Microbiol.* **178**: 161-164.
- Ades, S.E.** 2004. Control of the alternative sigma factor sigmaE in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 157-162.
- Alexander, D.B. & Zuberer, D.A.** 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol Fertil Soils.* **12**: 39-45.
- Amarger, N., Bours, M., Revoy, F., Allard, M.R. & Laguerre, G.** 1994. *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. *Plant Soil.* **2**: 147-156.
- Arcondeguy, T., Jack, R. & Merrick, M.** 2001. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol, Mol. Biol. Rev.* **65**: 80-105.
- Arianoutsou, M. & Thanos, C.A.** 1996. Legumes in the fire-prone Mediterranean regions: an example from Greece. *Int. J. Wildland Fire.* **6**: 77-82.
- Ault-Riché, D., Fraley, C.D., Tzeng, C.M. & Kornberg, A.** 1998. Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 1841-1847.
- Baev, N., Amar, M., Defez, R. & Iaccarino, M.** 1992. The expression of the *nodD* and *nodABC* genes of *Rhizobium leguminosarum* is not regulated in response to combined nitrogen. *FEMS Microbiol. Lett.* **97**: 205-208.
- Barcellos, F.G., Menna, P., da Silva Batista, J.S. & Hungria M.** 2007. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium* (*Sinorhizobium*) *fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 2635-2643.
- Barnett, M. J. & Long, S. R.** 1990. DNA sequence and translational product of a new nodulation-regulatory locus: *syrM* has sequence similarity to NodD proteins. *J. Bacteriol.* **172**: 3695-3700.
- Barnett, M.J., Swanson, J.A. & Long, S.R.** 1998. Multiple genetic controls on *Rhizobium meliloti* *syrA*, a regulator of exopolysaccharide abundance. *Genetics.* **148**: 19-32.
- Bassam, B. J., Djordjevic, M. A., Redmond, J. W., Batley, M. & Rolfe, B. G.** 1988. Identification of a *nodD*-dependent locus in the *Rhizobium* strain NGR234 activated by phenolic factors secreted by soybeans and other legumes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1**: 161-168.
- Bauer, W.D. & Teplitski, M.** 2001. Can plants manipulate bacterial quorum sensing?. *Aust. J. Plant Physiol.* **28**: 913-921.
- Bayuelo-Jiménez, J.S., Debouck, D.G. & Lynch, J.P.** 2002. Salinity tolerance in *Phaseolus* species during early vegetative growth. *Crop. Sci.* **42**: 2184-2192.
- Bec-Ferté, M.P., Krishnan, H.B., Savagnac, A., Pueppke, S.G. & Promé, J.C.** 1996. *Rhizobium fredii* synthesizes an array of lipooligosaccharides, including a novel compound with glucose inserted into backbone of the molecule. *FEBS Lett.* **393**: 273-279.

## Bibliografía

- Becker, A., Schmidt, M., Jager, W. & Puhler, A.** 1995. New gentamicin-resistance and *lacZ* promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene*. **162**: 37-39.
- Bekki, A., Trinchant, J.C. & Rigaud, J.** 1987. Nitrogen fixation ( $C_2H_2$  reduction) by *Medicago* nodules and bacteroids under sodium chloride stress. *Physiol. Plant.* **71**: 61-67.
- Bender, G. L., Nayudu, M., Strange, K. K. L. & Rolfe, B. G.** 1988. The *nodD1* gene from *Rhizobium* strain NGR234 is a key determinant in the extension of host range to the nonlegume *Parasponia*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1**: 259-266.
- Beringer, J.E.** 1974. R-factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **120**: 421-429.
- Bernabé, M., Jiménez-Barbero, J., Gil-Serrano, A.M., González-Jiménez, I., Tejero-Mateo, P. & Megias, M.** 1995. Solution structure of the trisaccharide and hexasaccharide fragments of the O-antigen of the lipopolysaccharide of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Carbohydr. Res.* **279**: 339-352.
- Bingle, L.E., Bailey, C.M. & Pallen, M.J.** 2008. Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**: 3-8.
- Bio-Rad Laboratories, Inc.** 2005. Real-Time PCR applications guide.
- Bittner, A.N., Foltz, A. & Oke, V.** 2007. Only one of five *groEL* genes is required for viability and successful symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **189**: 1884-1889.
- Bloemberg, G.V., Wijffjes, A.H., Lamers, G.E., Stuurman, N. & Lugtenberg, B.J.** 2000. Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**: 1170-1176.
- Bolaños-Vásquez, M.C. & Werner, D.** 1997. Effects of *Rhizobium tropici*, *R. etli*, and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* on *nod*-gene inducing flavonoids in root exudates of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 339-346.
- Bolton, H.J., Fredrickson, J.K. & Elliott L.** 1992. Microbial ecology of the rhizosphere. En: *Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management*. F.B. Metting Jr. (ed.), pp.: 27- 63. Inc., Nueva York (EEUU).
- Bortakur, D., Barber, C.E., Lamb, J.E., Daniels, M.J., Downie, J.A. & Johnston, W.B.** 1986. A mutation that blocks exopolysaccharide synthesis prevents nodulation of peas by *Rhizobium leguminosarum* but not beans by *R. phaseoli* and corrected by DNA from *Rhizobium* of the phytopathogen *Xanthomonas*. *Mol. Gen. Genetics.* **203**: 320-323.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brencic, A. & Winans, S.C.** 2005. Detection of a response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* **69**: 155-164.
- Brewin, N.** 2002. Root nodules (*Rhizobium*, Legumes). En: *Encyclopedia of Life Sciences*. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group, London.

- Broughton, W.J., Hanin, M., Relic, B., Kopcińska, J., Golinowski, W., Şimşek, Ş., Ojanen-Reuhs, T., Reuhs, B., Marie, C., Kobayashi, H., Bordogna, B., Le Quéré, A., Jabbouri, S., Fellay, R., Perret, X. & Deakin, W.J. 2006. Flavonoid-inducible modifications to rhamnan O antigens are necessary for *Rhizobium* sp. strain NGR234-legume symbioses. *J. Bacteriol.* **188**: 3654-3663.
- Broughton, W.J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P. & Vanderleyden, J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.)-model food legumes. *Plant Soil.* **252**: 55-128.
- Broughton, W.J., Jabbouri, S. & Perret, X. 2000. Keys to symbiotic harmony. *J. Bacteriol.* **182**: 5641-5652.
- Brown, A.D. & Simpson, J.R. 1972. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J. Gen. Microbiol.* **72**: 589-591.
- Burdman, S., Vedder, M., German, R., Itzigsohn, J., Kigel, E., Jurkevitch, Y. & Okon, Y. 1998. Legume crop yield promotion by inoculation with *Azospirillum*. En: *Biological Nitrogen Fixation for the 21<sup>st</sup> Century*. Emerich, C., Kondorosi, A. & Newton, W.E. (eds.), pp.: 609-612. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Cabello, P., Roldán M.D., Castillo, F. & Moreno-Vivián C. 2009. Nitrogen Cycle. (Chapter 55). En: *Encyclopedia of Microbiology* 3rd ed. (M. Schaechter ed.), pp.: 299-321. Elsevier, Oxford.
- Cárdenas, L., Feijó, J.A., Kunkel, J.G., Sánchez, F., Holdaway-Clarke, T., Hepler, P.K. & Quinto, C. 1999. *Rhizobium* Nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in vean root hairs. *Plant. J.* **19**: 347-352.
- Cárdenas, L., Thomas-Oates, J., Nava, N., López-Lara, I.M., Hepler P.K. & Quinto, C. 2003. The role of Nod factor substituents in actin cytoskeleton rearrangements in *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**: 326-334.
- Cárdenas, L., Vidali, L., Domínguez, J., Pérez, H., Sánchez, F., Hepler, P.K. & Quinto, C. 1998. Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals. *Plant Physiol.* **116**: 871-877.
- Carlson, R.W. 1984. Heterogeneity of *Rhizobium* lipopolysaccharides. *J. Bacteriol.* **158**: 1012-1017.
- Chiurazzi, M., Meza, R., Lara, M., Lahm, A., Defez, R., Iaccarino, M. & Espin, G. 1992. The *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* *glnT* gene, encoding glutamine synthetase III. *Gene.* **119**: 1-8.
- Christie, P.J. 2004. Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **1694**: 219-234.
- Chung, C., Niemela, S.L. & Miller, R.H. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* **6**: 2172-2175.
- Colnaghi, R., Rudnick, P., He, L., Green, A., Yan, D., Larson, E. & Kennedy, C. 2001. Lethality of *glnD* null mutations in *Azotobacter vinelandii* is suppressible by prevention of glutamine synthetase adenylylation. *Microbiology.* **147**: 1267-1276.
- Colonna-Romano, S., Riccio, A., Guida, M., Defez, R., Lamberti, A., Iaccarino, M., Arnold, W., Priefer, U. & Pühler, A. 1987. Tight linkage of *glnA* and a putative regulatory gene in *Rhizobium leguminosarum*. *Nucleic Acids Res.* **15**: 1951-1964.

## Bibliografía

- Contreras, A., Drummond, M., Bali, A., Blanco, G., García, E., Bush, G., Kennedy, C. & Merrick, M. 1991. The product of the nitrogen fixation regulatory gene *nfrX* of *Azotobacter vinelandii* is functionally and structurally homologous to the uridylyltransferase encoded by *glnD* in enteric bacteria. *J. Bacteriol.* **173**: 7741-7749.
- Cooper, J. E. 2004. Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. *Adv. Bot. Res.* **41**: 1-62.
- Cordovilla, M.P., Ligeró, F. & Lluch, C. 1995. Influence of host genotypes on growth, symbiotic performance and nitrogen assimilation in Faba bean (*Vicia faba* L.) under salt stress. *Plant Soil.* **172**: 289-297.
- Cornelis, G.R. & van Gijsegem, F. 2000. Assembly and function of type III secretion systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 735-774.
- Coronado, C., Silveira-Zuanazzi, J.A., Sallaud, C., Quirion, J.C., Esnault, R., Husson, H.P., Kondorosi, A. & Ratet, P. 1995. Alfalfa root flavonoid production is nitrogen regulated. *Plant Physiol.* **108**: 533-542.
- Corzo Varillas, J., Hernández Hernández, J. & Gutiérrez Navarro, A. 2006. Polisacáridos y lipopolisacáridos rizobianos. Estructura y papel en la simbiosis. En: *Fijación de nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones*. Bedmar, E.J., González, J., Lluch, C. & Rodelas, B. (eds.). Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), pp.: 148-159.
- Craig, G.F., Atkins, C.A. & Bell, D.T. 1991. Effect of salinity on growth of four strains of *Rhizobium* and their infectivity and effectiveness on two species of Acacia. *Plant Soil.* **133**: 253-262.
- Dakora, F.D. 2003. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. *New. Phytol.* **158**: 39-49.
- Dakora, F.D., Joseph C.M. & Phillips, D.A. 1993. Common bean roots exudates contain elevated levels of daidzein and coumestrol in response to *Rhizobium* inoculation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 665-668.
- Daniels, R., De Vos, D.E., Desair, J., Raedschelders, G., Luyten, E., Rosemeyer, V., Verreth, C., Schoeters, E., Vanderleyden, J. & Michiels, J. 2002. The *cin* quorum-sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. *J. Biol. Chem.* **277**: 426-430.
- Dardanelli, M.S., Fernández de Córdoba, F.J., Espuny, M.R., Rodríguez-Carvajal, M.A., Soria Díaz, M.E., Gil-Serrano, A.M., Okon, Y. & Megías, M. 2008. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. *Soil Biol. Biochem.* **40**: 2713-2721.
- Darrow, R.A. & Knotts, R.R. 1977. Two forms of glutamine synthetase in free-living root-nodule bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**: 554-559.
- Deakin, W.J. & Broughton, W.J. 2009. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 312-320.
- Debellé, F., Planazet, C., Roche, P., Pujol, C., Savagnac, A., Rosenberg, C., Promé, J.C. & Dénarié, J. 1996. The NodA proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the N-acylation of Nod factors by different fatty acids. *Mol. Microbiol.* **22**: 303-314.

- del Castillo, I.** 2010. Estudio de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal asociados al cultivo de arroz y evolución de la diversidad microbiana característica en las marismas del Guadalquivir. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. Sevilla (España).
- Delgado, M.J., Ligeró, F. & Lluch, C.** 1994. Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 371-376.
- de Maagd, R.A., Wijffelman, C.A., Pees, E. & Lugtenberg, B.J.J.** 1988. Detection and subcellular localization of two Sym plasmid-dependent proteins of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *J. Bacteriol.* **170**: 4424-4427.
- Demerec, M., Adelberg, E.A., Clark, A.J. & Hartman, P.E.** 1966. A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics.* **54**: 61-76.
- Demont-Caulet, N., Maillet, F., Tailler, D., Jacquinet, J.C., Promé, J.C., Nicolaou, K.C., Truchet, G., Beau, J.M. & Dénarié, J.** 1999. Nodule-inducing activity of synthetic *Sinorhizobium meliloti* nodulation factors and related lipochitooligosaccharides on alfalfa. Importance of the acyl chain structure. *Plant Physiol.* **120**: 83-92.
- Demont, N., Ardourel, M., Maillet, F., Promé, D. & Ferro, M.** 1994. The *Rhizobium meliloti* regulatory *nodD3* and *syrM* genes control the synthesis of a particular class of nodulation factors N-acylated by (omega-1)-hydroxylated fatty acids. *EMBO J.* **13**: 2139-2149.
- Dénarié, J., Debelle, F. & Promé, J.C.** 1996. Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signalling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 503-535.
- D'Haese, W. & Holsters, M.** 2002. Nod factors structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology.* **12**: 79-105.
- D'Haese, W. & Holsters, M.** 2004. Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity. *Trends Microbiol.* **12**: 555-561.
- Downie, J. A.** 1998. Functions of rhizobial nodulation genes. En: *The Rhizobiaceae, the molecular biology of model plant associated bacteria*. Spink, H. P., Kondorosi, A. and Hooykaas, P.J.J. (eds.), pp.: 387-402. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands.
- Downie, J.A.** 2010. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**: 150-170.
- Downie, J.A. & Walker, S.A.** 1999. Plant responses to nodulation factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 483-489.
- Drevon, J.J., Abdelly, C., Amarger, N., Aouani, E.A., Aurag, J., Gherbi, H., Jebara, M., Lluch, C., Payre, H., Schump, O., Soussi, M., Sifi, B. & Trabelsi, M.** 2001. An interdisciplinary research strategy to improve symbiotic nitrogen fixation and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in salinised areas of the Mediterranean basin. *J. Biotechnol.* **91**: 257-268.
- Duranti, M. & Gius, C.** 1997. Legume seeds: Protein content and nutritional value. *Field Crops Res.* **53**: 31-45.
- Dusha, I. & Kondorosi, A.** 1993. Genes at different regulatory levels are required for the ammonia control of nodulation in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* **240**: 435-444.

## Bibliografía

- Eckhardt, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid*. **1**: 584-588.
- Edwards, R. & Merrick, M. 1995. The role of uridylyltransferase in the control of *Klebsiella pneumoniae* *nif* gene regulation. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 189-198.
- Ehrhardt, D.T., Wais, R. & Long, S.R. 1996. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell*. **85**: 673-681.
- Ehrhardt, D.W., Atkinson, E.M. & Long, S.R. 1992. Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science*. **256**: 998-1000.
- Encarnación, S., Guzmán, Y., Dunn, M.F., Hernández, M., del Carmen, V.M. & Mora, J. 2003. Proteome analysis of aerobic and fermentative metabolism in *Rhizobium etli* CE3. *Proteomics*. **3**: 1077- 1085.
- Elías, J.M., Julieta, P.G., Althabegoiti, M.J., Covelli, J., Quelas, J.I., Silvina, L.L.G. & Lodeiro, A.R. 2009. Overproduction of the rhizobial adhesin RapA1 increases competitiveness for nodulation. *Soil Biol. Biochem.* **41**: 2017- 2020.
- El-Sheikh, E.A.E. & Wood, M. 1990. Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Exp. Bot.* **41**: 1263-1269.
- Espuny, M.R., Ollero, F.J., Bellogín, R.A., Ruíz-Sainz, J.E. & Pérez-Silva, J. 1987. Transfer of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* symbiotic plasmid pRtr5a to a strain of *Rhizobium* sp. that nodulates on *Hedysarum coronarium*. *J. App. Microbiol.* **63**: 13-20.
- Esseling, J.J. & Emons, A.M.C. 2004. Dissection of Nod factor signalling in legumes: cell biology, mutants and pharmacological approaches. *J. Microscopy*. **214**: 104-113.
- Esseling, J.J., Lhuissier, F.G. & Emons, A.M. 2003. Nod factor-induced root air curling: continuous polar growth towards the point of Nod factor application. *Plant Physiol.* **132**: 1982-1988.
- Estévez, J. 2007. Implicaciones básicas y aplicadas de la interacción triple rizobio-PGPR-leguminosa. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. Sevilla (España).
- Estévez, J., Soria-Díaz, M.E., Fernández de Córdoba, F., Morón, B., Manyani, H., Gil, A., Thomas-Oates, J., van Brussel, A.A.N., Dardanelli, M.S., Sousa, C. & Megías, M. 2009. Different and new Nod factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899 following Na<sup>+</sup> stress. *FEMS Microbiol. Lett.* **293**: 220-231.
- Etzler, M.E., Kalsi, G., Ewing, N.N., Roberts, N.J., Day, R.B. & Murphy, J.B. 1999. A Nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**: 5856-5861.
- Fellay, R., Hanin, M., Montorzi, G., Frey, J., Freiberg, C., Golinowski, W., Staehelin, C., Broughton, W. J. & Jabbouri, S. 1998. *nodD2* of *Rhizobium* sp. NGR234 is involved in the repression of the *nodABC* operon. *Mol. Microbiol.* **27**: 1039-1050.
- Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A. & Schultze, M. 1998. The role of ion fluxes in Nod factor signalling in *Medicago sativa*. *Plant J.* **13**: 455-463.
- Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A. & Schultze, M. 2000. How alfalfa root hairs discriminate between Nod factors and oligochitin elicitors. *Plant Physiol.* **124**: 1373-1380.

- Fernández de Córdoba, F.J., Rodríguez-Carvajal, M.A., Tejero-Mateo, P., Corzo, J. & Gil-Serrano, A.M.** 2008. Structure of the O-antigen of the main lipopolysaccharide isolated from *Sinorhizobium fredii* SMH12. *Biomacromol.* **9**: 678-685.
- Figurski, D. H. & Helinski, D. R.** 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **76**: 1648-52.
- Fischer, H.M.** 1996. Environmental regulation of rhizobial symbiotic nitrogen fixation genes. *Trends Microbiol.* **4**: 317-320.
- Fisher, R.F., Egelhoff, T.T., Mulligan, J.T. & Long, S.R.** 1988. Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free extracts containing NodD to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. *Genes Dev.* **2**: 282-293.
- Folch-Mallol, J.L., Manyani, H., Marroquí, S., Sousa, C., Vargas, C., Nava, N., Colmenero-Flores, C., Quinto, C. & Megías, M.** 1998. Sulfation of Nod factors via *nodHPQ* is *nodD* independent in *Rhizobium tropici* CIAT899. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 979-987.
- Folch-Mallol, J.L., Marroquí, S., Sousa, C., Manyani, H., López-Lara, I.M., van der Drift, K.M.G.M., Haverkamp, J., Quinto, C., Gil-Serrano, A., Thomas-Oates, J., Spaink, H.P. & Megías, M.** 1996. Characterization of *Rhizobium tropici* CIAT899 nodulation factors: the role of *nodH* and *nodPQ* genes in their sulfation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**: 151-163.
- Forsberg, L.S. & Reuhs B.L.** 1997. Structural characterization of the K antigens from *Rhizobium fredii* USDA257: evidence for a common structural motif, with strain-specific variation, in the capsular polysaccharides of *Rhizobium* spp. *J. Bacteriol.* **179**: 5366-5371.
- Fougère, F. & Le Rudulier, D.** 1990. Glycine betaine biosynthesis and catabolism in bacteroids of *Rhizobium meliloti*: effects of salt stress. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 2503-2510.
- Fox, M.A., White, J.P., Hosie, A.H.F., Lodwig, E.M. & Poole, P.S.** 2006. Osmotic upshift transiently inhibits uptake via ABC transporters in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **188**: 5304-5307.
- Frayse, N., Couderc, F. & Poinso, V.** 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* **270**: 1365-1380.
- 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.
- Gao, M., Teplitski, M., Robinson, J.B. & Bauer, W.D.** 2003. Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**: 827-834.
- García, M.L., Dunlap, J., Loh, J. & Stacey, G.** 1996. Phenotypic characterization and regulation of the *nolA* gene of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**: 625-635.
- GE Healthcare.** 2-D Electrophoresis. Principles and Methods. 80-6429-60.
- Geurts, R. & Bisseling, T.** 2002. *Rhizobium* Nod factor perception and signalling. *Plant. Cell. Supplement.* **2002**: S239-S249.

## Bibliografía

- Geurts, R., Fedorova, E. & Bisseling, T. 2005. Nod factor signalling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 346-352.
- Gibson, K.E., Barnett, M.J., Toman, C.J., Long S.R. & Walker, G.C. 2007. The symbiosis regulator CbrA modulates a complex regulatory network affecting the flagellar apparatus and cell envelope proteins. *J. Bacteriol.* **189**: 3591-3602.
- Gibson, K.E., Kobayashi, H. & Walker, G.C. 2008. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu. Rev. Genet.* **42**: 413-441.
- Gil-Serrano, A.M., Franco-Rodríguez, G., González-Jiménez, I., Tejero-Mateo, P., Molina Molina, J., Dobado, J.A., Megías, M. & Romero, M.J. 1994a. The structure and molecular mechanics calculations of the cyclic (1→2)-β-D-glucan secreted by *Rhizobium tropici* CIAT899. *J. Mol. Struct.* **301**: 211-226.
- Gil-Serrano, A.M., González-Jiménez, I., Tejero-Mateo, P., Bernabé, M., Jiménez-Barbero, J., Megías, M. & Romero-Vázquez, M.J. 1995. Structural analysis of the O-antigen of the lipopolysaccharide of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Carbohyd. Res.* **275**: 285-294.
- Gil-Serrano, A.M., González-Jiménez, I., Tejero-Mateo, P., Megías, M. & Romero-Vázquez, M.J. 1994b. Analysis of the lipid moiety of lipopolysaccharide from *Rhizobium tropici* CIAT899: identification of 29-hydroxytriacontanoic acid. *J. Bacteriol.* **176**: 2454-2457.
- Gil-Serrano, A.M., Sánchez del Junco, A., Tejero-Mateo, P., Megías, M. & Caviedes, M.A. 1990. Structure of the extracellular polysaccharide secreted by *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CIAT899. *Carbohyd. Res.* **204**: 103-107.
- Gleason, C., Chaudhuri, S., Yang, T., Muñoz, A., Poovaiah, B.W. & Oldroyd, G.E.D. 2006. Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature.* **44**: 1149-1152.
- González, J. E. & Marketon, M. M. 2003. Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 574-592.
- Gopalakrishnan, C., Gadepalli, K.S., Cox, L.J. & Leung, P.S. 1993. The economics of biomass energy: a case study from Hawaii. *Biores. Technol.* **45**: 137-143.
- Gottesman, S. 2005. Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet.* **21**: 399-404.
- Gould, P., Maguire, M. & Lund, P.A. 2007. Distinct mechanisms regulate expression of the two major *groEL* homologues in *Rhizobium leguminosarum*. *Arch. Microbiol.* **187**: 1-14.
- Graft, J. & Ruby, E.G. 2000. Novel effects of a transposon insertion in the *Vibrio fischeri glnD* gene: defects in iron uptake and symbiotic persistence in addition to nitrogen utilization. *Mol. Microbiol.* **37**: 168-179.
- Graham, P.H. 1992. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* **38**: 475-484.
- Graham, P.H., K.J. Draeger, M.L. Ferrey, M.J. Conroy, B.E. Hammer, E. Martínez, S.R. Aarons, & C. Quinto. 1994. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR 1899. *Can. J. Microbiol.* **40**: 198-207.

- Gray, E.J. & Smith, D.L. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signalling processes. *Soil Biol. Biochem.* **37**: 395-412.
- Greenway, H. & Munns, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in non halo-phytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**: 149-190.
- Guerreiro, N., Djordjevic, M.A. & Rolfe, B.G. 1999. Proteome analysis of the model microsymbiont *Sinorhizobium meliloti*: isolation and characterization of novel proteins. *Electrophoresis.* **20**: 818- 825.
- Guerreiro, N., Redmond, J.W., Rolfe, B.G. & Djordjevic, M.A. 1997. New *Rhizobium leguminosarum* flavonoid-induced proteins revealed by proteome analysis of differentially displayed proteins. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**: 506- 516.
- Hanin, M., Jabbouri, S., Broughton, W.J. & Fellay, R. 1998. *SyrM1* of *Rhizobium* sp. NGR234 activates transcription of symbiotic loci and controls the level of sulphated Nod factors. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 343-350.
- Harborne, J.B. & Williams, C.A. 2001. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* **18**: 310-333.
- Henderson, I.R., Navarro-García, F., Desvaux, M., Fernández, R.C. & Ala'Aldeen, D. 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **68**: 692-744.
- Hernández-Lucas, I., Segovia, L., Martínez-Romero, E. & Pueppke, S.G. 1995. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2775-2779.
- Higgins, C.F., Hyde, S.C., Mimmack, M.M., Gileadi, U., Gill, D.R. & Gallagher, M.P. 1990. Binding protein-dependent transport systems. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**: 571-592.
- Hirsch, A.M. 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* **112**: 211-237.
- Hong, G.F., Burn, J.E. & Johnston, A.W.B. 1987. Evidence that DNA involved in the expression of nodulation (*nod*) genes in *Rhizobium* binds to the product of the regulatory gene *nodD*. *Nucleic Acids Research.* **23**: 9677-9690.
- Honma, M. A., Asomaning, M. & Ausubel, F. M. 1990. *Rhizobium meliloti nodD* genes mediate host-specific activation of *nodABC*. *J. Bacteriol.* **172**: 901-911.
- Honma, M. A. & Ausubel, F.M. 1987. *Rhizobium meliloti* has three functional copies of the *nodD* symbiotic regulatory gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* **84**:8558-8562.
- Hooymaas, P.J.J., Klapwijk, P.M., Nuti, M.P., Schilperoort, R.A. & Rorsch, A. 1977. Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* TI plasmid to avirulent *Agrobacteria* and to *Rhizobium ex planta*. *J. Gen. Microbiol.* **98**: 477- 484.
- Hua, S-S. T., Tsai, V.Y., Lichens, G.M. & Noma, A.T. 1982. Accumulation of amino acids in *Rhizobium* sp. strain WR1001 in response to sodium chloride salinity. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 135-140.
- Hubber, A.M., Sullivan, J.T. & Ronson, C.W. 2007. Symbiosis-induced cascade regulation of the Mesorhizobium loti R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Mol. Plant. Microbe In.* **20**: 255-261.

## Bibliografía

- Hungría, M., Andrade, D.S., Chueire, L.M.O., Probanza, A., Guttierrez-Mañero, F.J. & Megías, M. 2000. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol. Biochem.* **32**: 1515-1528.
- Hungría, M., Campos, R.J. & Carvalho-Mendes, I.C. 2003. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biol. Fertil. Soils.* **39**: 88-93.
- Hungría, M., Joseph, C.M. & Phillips, D.A. 1991a. *Rhizobium nod* gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* **97**: 759-764.
- Hungría, M., Joseph, C.M. & Phillips, D.A. 1991b. Anthocyanidins and flavonols, major *nod* gene inducers from seeds of a black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* **97**: 751-758.
- Hungría, M. & Vargas, M.A.T. 2000. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Res.* **65**: 151-164.
- Hunt, T.P. & Magasanik, B. 1985. Transcription of *glnA* by purified *Escherichia coli* components: core RNA polymerase and the products of *glnF*, *glnG* and *glnL*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 8453-8457.
- Jilk, R.A., Makris, L.C., Borchardt, L. & Reznikoff, W.S. 1993. Implications of Tn5-associated adjacent deletions. *J. Bacteriol.* **175**: 1264-1271.
- Jitackson, S. & Sadowsky, M.J. 2008. Nodulation gene regulation and quorum sensing control density-dependent suppression and restriction of nodulation in the *Bradyrhizobium japonicum*-soybean symbiosis. *Appl. Environ. Microb.* **74**: 3749-3756.
- Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M.E. & Walker, G.C. 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 619-33.
- Jones, K.M., Sharopova, N., Lohar, D.P., Zhang, J.Q., VandenBosch, K.A. & Walker G.C. 2008. Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont *Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide-deficient mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**: 704-709.
- Jordan, D.C. 1984. *Rhizobiaceae* Conn 1938. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg, N.R. & Holt, J.G. (eds.), pp.: 235-244. Willians & Wilkins Co., London.
- Kahn, M.L., McDermott, T.R. & Udvardi, M.K. 1998. Carbon and nitrogen metabolism in rhizobia. En: *The Rhizobiaceae*. H.P. Spaink, A. Kondorosi y P.J.J. Hooykaas. (eds.), pp.: 417-429. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (Holanda).
- Kaminski, P.A., Batut, J. & Boistard, P. 1998. A survey of symbiotic nitrogen fixation by rhizobia. En: *The Rhizobiaceae*. Spaink, H. P., Kondorosi, A. y Hooykaas, P. J. J. (eds.), pp. 431-456. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers.
- Kamst, E., van der Drift, K.M., Thomas-Oates, J., Lugtenberg, B.J.J. & Spaink, H.P. 1995. Mass spectrometric analysis of chitin oligosaccharides produced by *Rhizobium NodC* protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **21**: 6282-6285.
- Kannenberg, E.L. & Carlson, R.W. 2001. Lipid A and O-chain modifications cause *Rhizobium* lipopolysaccharides to become hydrophobic during bacteroid development. *Mol. Microbiol.* **39**: 379-391.

- Kannenbergh, E.L., Reuhs, B.D., Forsberg, S. & Carlson, R.W.** 1998. Lipopolysaccharides and K-antigens: their structures, biosynthesis, and functions, pp. 119-154. En *The Rhizobiaceae*. Editores: H.P. Spaink, A. Kondorosi & P.J.J. Hooykaas. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (Holanda).
- Kaufusi, P.H., Forsberg, L.S., Tittabutr, P. & Borthakur, D.** 2004. Regulation of exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium* sp. strain TAL1145 involves an alternative sigma factor gene, *rpoH2*. *Microbiology*. **150**: 3473-3482.
- Kereszt, A., Kiss, E., Reuhs, B., Carlson, R., Kondorosi, A. & Putnoky, P.** 1998. Novel *rkp* gene clusters of *Sinorhizobium meliloti* involved in capsular polysaccharide production and invasion of the symbiotic nodule: the *rkpK* gene encodes a UDP-glucose dehydrogenase. *J. Bacteriol* **180**: 5426-5431.
- Kiss, E., Mergaert, P., Oloh, B., Kereszt, A., & Staehelin, C.** 1998. Conservation of *nolR* in the *Sinorhizobium* and *Rhizobium* genera of the *Rhizobiaceae* family. *Mol Plant-Microbe Interact.* **12**: 1186-1195.
- Kluepfel, D.A.** 1993. The behaviour and tracking of bacteria in the rhizosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**: 441-472.
- Kondorosi, E., Buiré, M., Cren, M., Iyer, N., Hoffmann, B. & Kondorosi, A.** 1991. Involvement of the *syrM* and *nodD3* genes of *Rhizobium meliloti* in *nod* gene activation and in optimal nodulation of the plant host. *Mol. Microbiol.* **5**: 3035-3048.
- Kondorosi, E., Gyuris, J., John, M., Duda, E., Hoffman, B., Schell, J. & Kondorosi, A.** 1989. Positive and negative control of *nod* gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. *EMBO J.* **8**: 1331-1341.
- Köplin, R., Wang, G., Hotte, B., Priefer, U.B. & Pühler, A.** 1993. A 3.9-kb DNA region of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* that is necessary for lipopolysaccharide production encodes a set of enzymes involved in the synthesis of dTDP-rhamnose. *J Bacteriol.* **175**: 7786- 7792.
- Koronakis, V., Eswaran, J. & Hughes, C.** 2004. Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu. Rev. Biochem.* **73**: 467-489.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop II, R.M. & Peterson, K.M.** 1995. Four derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene.* **166**: 175-176.
- Krehenbrink, M. & Downie, J.A.** 2008. Identification of protein secretion systems and novel secreted proteins in *Rhizobium leguminosarum* bv.viciae. *BMC Genomics.* **9**: 55.
- Kwon, S-W., Young Park, J., Kim, J-S., Kang, J-W., Cho, J-H., Lim, C-K., Parker, M.A. & Lee, G-B.** 2005. Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 263-270.
- LaBaer, J. & Ramachandran, N.** 2005. Protein microarrays as tools for functional proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**: 14-19.
- Ladha, J.K. & Peoples, M.B.** (eds.). 1995. Management of biological nitrogen fixation for the development of more productive and sustainable agricultural systems. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

## Bibliografía

- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Laeremans, T. & Vanderleyden, J. 1998. Review: infection and nodulation signalling in *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 787-808.
- Lamrabet, Y., Belloguín, R.A., Cubo, T., Espuny, R., Gil, A., Krishnan, H.B., Megías, M., Ollero, F.J., Pueppke, S.G., Ruíz-Sainz, J.E., Spaink, H.P., Tejero-Mateo, P., Thomas-Oates, J. & Vinardell, J.M. 1999. Mutation in GDP-fucose synthesis genes of *Sinorhizobium fredii* alters Nod factors and significantly decreases competitiveness to nodulate soybeans. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**: 207-217.
- Lee, V.T. & Schneewind, O. 2001. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Develop.* **15**: 1725-1752.
- Lepek, V.C. & D'Antuono, A.L. 2005. Bacteria surface polysaccharides and their role in the rhizobia-legume association. *Lotus Newslet.* **35**: 93-105.
- le Queré, A.J., Deakin, W.J., Schmeisser, C., Carlson, R.W., Streit, W.R., Broughton, W.J. & Forsberg, L.S. 2006. Structural characterization of a K-antigen capsular polysaccharide essential for normal symbiotic infection in *Rhizobium* sp. NGR234: deletion of the *rkpMNO* locus prevents synthesis of 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetra-deoxy-non-2-ulosonic acid. *J. Biol. Chem.* **281**: 28981-28992.
- Lloret, L. & Martínez-Romero, E. 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Rev. Lat. Microbiol.* **47**: 43-60.
- Loh, J., Carlson, R.W., York, W.S. & Stacey, G. 2002a. Bradyoxetin, a unique chemical signal involved in symbiotic gene regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**: 14446-14451.
- Loh, J., García, M. & Stacey, G. 1997. NodV and NodW, a second flavonoid recognition system regulating nod gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **179**: 3013-3020.
- Loh, J., Lohar, D.P., Andersen, B. & Stacey, G. 2002b. A two-component regulator mediates population density dependent expression of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. *J. Bacteriol.* **184**: 1759-1766.
- Long, S.R., R.F. Fisher, J. Ogawa, J.J. Swanson, D. W. Erhardt, E.M. Atkinson & J. Schwedock. 1991. *Rhizobium meliloti* nodulation gene regulation and molecular signals. En: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Hennecke, H., and Verma, D.P.S (eds.), pp. 127-133. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Machado, D. & Krishnan, H.B. 2003. *nodD* alleles of *Sinorhizobium fredii* USDA 191 differentially influence soybean nodulation, *nodC* expression, and production of exopolysaccharides. *Curr. Microbiol.* **47**: 134-137.
- MacKay, T. & Djordjevic, M.A. 1993. Production and excretion of Nod metabolites by *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii are disrupted by the same environmental factors that reduce nodulation in the field. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3385-3392.
- Madinabeitia, N., Bellogín, R. A., Buendía-Clavería, A. M., Camacho, M., Cubo, T., Espuny, M.R., Gil-Serrano, A. M., Lyra, M. C. C. P., Moussaid, A., Ollero, F. J. Soria-Díaz, M. E., Vinardell, J. M., Zeng, J. & Ruiz-Sainz, J. E. 2002. *Sinorhizobium fredii* HH103 has a truncated *nolO* gene due to a -1 frameshift mutation that is conserved

- among other geographically distant *S. fredii* strains. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**: 150-159.
- Manhart, J.R. & Wong, P.P.** 1979. Nitrate reductase activities of rhizobia and the correlation between nitrate reduction and nitrogen fixation. *Can. J. Microbiol.* **25**: 1169-1174.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J.** 1982. *Molecular cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU.
- Manyani, H., Sousa, C., Soria-Díaz, M.E., Gil-Serrano, A.M. & Megías, M.** 2001. Regulation of Nod factor sulphation genes in *Rhizobium tropici* CIAT899. *Can. J. Microbiol.* **47**: 574-579.
- Martin, J.B., Chapman, K.A. & Chelm, B.K.** 1988. Role of the *Bradyrhizobium japonicum* *ntnC* gene product in differential regulation of the glutamine synthetase II gene (*glnII*). *J. Bacteriol.* **170**: 5452-5459.
- Martínez-Romero, E.** 2003. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant Soil.* **252**: 11-23.
- Martínez-Romero, E. & Caballero-Mellado, J.** 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit. Rev. Plant Sci.* **15**: 113-140.
- Martínez-Romero, E., Pardo, M.A., Palacios, R. & Cevallos, M.A.** 1985. Reiteration of nitrogen fixation genes sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1779-1786.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Martins Mercante, F., Franco, A.A., Graham, P. & Pardo, M.A.** 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. System. Bacteriol.* **41**: 417-426.
- McIver, J., Djordjevic, M.A., Weinman, J.J., Bender, G.L. & Rolfe, B.G.** 1989. Extension of host range of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii caused by point mutations in *nodD* that result in alterations in regulatory function and recognition of inducer molecules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2**: 97-106.
- Megías, M., Folch, J.L. & Sousa, C.** 1993. Control of the expression of bacterial genes involved in symbiotic nitrogen fixation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 444-454.
- Mendoza, A., Leija, A., Martínez-Romero, E., Hernandez, G. & Mora, J.** 1995. The enhancement of ammonium assimilation in *Rhizobium etli* prevents nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**: 584-592.
- Mergaert, P., van Montagu, P. & Holster, M.** 1997. Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Mol. Microbiol.* **25**: 811-817.
- Merrick, M.J. & Edwards, R.A.** 1995. Nitrogen control in bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**: 604-622.
- Miller, J.H.** 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Miller, K.J. & Wood, J.M.** 1996. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. microbiol.* **50**: 101-136.
- Milner, J.L., Araujo, R.S. & Handelsman, J.** 1992. Molecular and symbiotic characterization of exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium tropici* strain CIAT899. *Mol. Microbiol.* **6**: 3137-3147.

## Bibliografía

- Minami, E., Kouchi, H., Cohn, J.R., Ogawa, T. & Stacey, G. 1996. Expression of the early nodulin, ENOD40, in soybean roots in response to various lipo-chitin signal molecules. *Plant. J.* **10**: 23-32.
- Mithöfer, A. 2002. Suppression of plant defense in rhizobia-legume symbiosis. *Trends Plant Sci.* **7**: 440-444.
- Mitsui, H., Sato, T., Ito, N. & Minamisawa, K. 2004. *Sinorhizobium meliloti* RpoH1 is required for effective nitrogen-fixing symbiosis with alfalfa. *Mol. Gen. Genomics.* **271**: 416-425.
- Morón, B. 2004. Influencia del estrés abiótico en el establecimiento de la simbiosis *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium* spp. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. Sevilla (España).
- Morón, B., Soria-Díaz, M.E., Ault, J., Verroios, G., Sadaf, N., Rodríguez- Navarro, D.N., Gil-Serrano, A., Thomas-Oates, J., Megías, M. & Sousa, C. 2005. Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899. *Chem. Biol.* **12**: 1029-1040.
- Mostasso, L., Mostasso, F.L., Dias, B.G., Vargas, M.A.T. & Hungría, M. 2002. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for Brazilian Cerrados. *Field. Crops. Res.* **73**: 121-132.
- Musarrat, J., Zaidi, A. & Khan, M. S. 2010. Recent advances in *Rhizobium*-legume interactions: a proteomic approach. En: *Microbes for Legume Improvement*. M.S. Khan *et al.* (eds), pp.: 81- 101. Springer-Verlag, Wien.
- Niehaus, K., Lagares, A. & Puhler, A. 1998. A *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant induces effective nodules on the host plant *Medicago sativa* (alfalfa) but fails to establish a symbiosis with *Medicago truncatula*. *Mol. Plant. Microbe. Int.* **11**: 906-914.
- Nogales, J., Campos, R., BenAbdelkhalek, H., Olivares, J., Lluch, C. & Sanjuán, J. 2002. *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 225-232.
- Nystrom, T. 1998. To be or not to be: the ultimate decision of the growth-arrested bacterial cell. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 283- 290.
- O'Connell, K.P., Raffel, S.J., Saville, B.J., & Handelsman, J. 1998. Mutants of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 that do not induce chlorosis in plants. *Microbiology.* **144**: 2607-2617.
- Oldroyd, G.E.D. & Downie, J.A. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 519- 546.
- Olsthoorn, M.A.M., Stokvis, E., Haverkamp, J., Spaink, H.P. & Thomas-Oates, J.E. 2000. Growth temperature regulation of host-specific modifications of rhizobial lipo-chitin oligosaccharides: the function of *nodX* is temperature regulated. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 808-813.
- Ormeño-Orrillo, E., Rosenblueth, M., Luyten, E., Vanderleyden, J. & Martínez-Romero, E. 2008. Mutations in lipopolysaccharide biosynthetic genes impair maize rhizosphere and root colonization of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Environ Microbiol.* **10**(5):1271-1284.

- Panter, S., Thomson, R., de Bruxelles, G., Laver, D., Trevaskis, B. & Udvardi, M.** 2000. Identification with proteomics of novel proteins associated with the peribacteroid membrane of soybean root nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**: 325- 333.
- Parada, M., Vinardell, J.M., Ollero, F.J., Hidalgo, A., Gutiérrez, R., Buendía-Clavería, A.M., Lei, W., Margaret, I., López-Baena, F.J., Gil-Serrano, A.M., Rodríguez-Carvajal, M.A., Moreno, J. & Ruiz-Sainz, J.E.** 2006. *Sinorhizobium fredii* HH103 mutants affected in capsular polysaccharide (KPS) are impaired for nodulation with soybean and *Cajanus cajan*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**: 43-52.
- Parniske, M. & Downie, J.A.** 2003. Plant biology: locks, keys and symbioses. *Nature.* **425**: 569- 570.
- Patriarca, E.J., Taté, R. & Iaccarino M.** 2002. The role of bacterial NH<sub>4</sub><sup>+</sup> metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 203-222.
- Patriarca, E.J., Tatè, R., Ferraioli, S. & Iaccarino, M.** 2004. Organogenesis of the legume root nodules. *Int. Rev. Citol.* **234**: 201-262.
- Peck, M.C., Fisher, R.F. & Long, S.R.** 2006. Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to *nod* gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **188**: 5417-5427.
- Pellock, B.J., Cheng, H.P. & Walker, G.C.** 2000. Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *J. Bacteriol.* **182**: 4310-4318.
- Pellock, B.J., Teplitski, M., Boinay, R.P., Bauer, W.D. & Walker, G.C.** 2002. A LuxR homolog control production of symbiotically active extracellular polysaccharide II by *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **184**: 5067-5076.
- Pérez-Montaña, F., Guasch-Vidal, B., González-Barroso, S., López-Baena, F.J., Cubo, T., Ollero, F.J., Gil-Serrano, A.M., Rodríguez-Carvajal, M.A., Bellogín, R. & Espuny, M.R.** 2011. Nodulation gene inducer flavonoids increase the overall production of autoinducers and 1 the expression of *N*-acyl homoserine lactone synthesis genes in rhizobia. *Res. Microbiol.* doi:10.1016/j.resmic.2011.05.002.
- Perret, X., Staehelin, C. & Broughton, W.J.** 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 180-201.
- Peters, J.W. & Szilagyi, R.K.** 2006. Exploring new frontiers of nitrogenase structure and mechanism. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**: 101-108.
- Petrovics, G., Putnoky, P., Reuhs, B., Kim, J., Thorp, T.A., Noel, K.D., Carlson, R.W. & Kondorosi, A.** 1993. The presence of a novel type of surface polysaccharide in *Rhizobium meliloti* requires a new fatty acid synthase-like gene cluster involved in symbiotic nodule development. *Mol. Microbiol.* **8**: 1083-1094.
- Phillips, D.A.** 1992. Flavonoids plant signal to soil microbes. *Recent. Adv. Phytocem.* **26**: 201-231.
- Phillips, D.A., Dakora, F.D., Sande, E., Joseph, C.M. & Zon, J.** 1994. Synthesis, release and transmission of alfalfa signals to rhizobial symbionts. *Plant Soil.* **161**: 69-80.
- Phillips, D.A., Joseph, C.M. & Maxwell, C.A.** 1992. Trigonelline and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* **99**: 1526-1531.

## Bibliografía

- Poolman, B., Spitzer, J.J. & Wood, J.M. 2004. Bacterial osmosensing: roles of membrane structure and electrostatics in lipid-proteins and protein-proteins interactions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1666**: 88-104.
- Powell, B.S. & Court, D.L. 1998. Control of *ftsZ* expression, cell division, and glutamine metabolism in Luria-Bertani medium by the alarmone ppGpp in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 1053-1062.
- Prentki, P. & Krisch, H.M. 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene.* **29**: 303-313.
- Priever, U.B., Aurag, J., Boesten, B., Bouhmouch, I., Defez, R., Filali-Maltouf, A., Miklis, M., Moawad, H., Mouhsine, B., Prell, J., Schluter, A. & Senatore, B. 2001. Characterization of *Phaseolus* symbionts isolated from Mediterranean soils and analysis of genetic factors related to pH tolerance. *J. Biotechnol.* **91**: 223-236.
- Raetz, C.R.H. & Whitfield, C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 635-700.
- Raymond, J., Siefert, J.L., Staples, C.R. & Blankenship, R.E. 2004. The natural history of nitrogen fixation. *Mol. Biol. Evol.* **21**: 541-554.
- Reinhard Simon. 1984. High frequency mobilization of Gram-negative bacterial replicons by the *in vitro* constructed Tn5-Mob transposon. *Mol. Gen. Genet.* **196**: 413-420.
- Reitzer, L.J. 1996. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine. pp: 391-407. En: *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, F.C. Neidhardt et al. (ed). ASM Press, Washington, D.C.
- Relic, B., Perret, X., Estrada-García, M. T., Kopcinska, J., Grolinowski, W., Krishnan, H. B., Pueppke, S. G. & Broughton, W. J. 1994. Nod factors of *Rhizobium* are a key to the legume door. *Mol. Microbiol.* **13**: 171-178.
- Reuhs, B.L., Carlson, R.W. & Kim, J.S. 1993. *Rhizobium fredii* and *Rhizobium meliloti* produce 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid-containing polysaccharides that are structurally analogous to group II K antigens (capsular polysaccharides) found in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 3570-3580.
- Reuhs, B.L., Geller, D.P., Kim, J.S., Fox, J.E., Kolli, V.S. & Pueppke, S.G. 1998. *Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium meliloti* produce structurally conserved lipopolysaccharides and strain-specific K antigens. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4930-4938.
- Riccillo, P.M., Muglia, C.I., de Bruijn, F.J., Roe, A.J., Booth, I.R. & Aguilar, O.M. 2000. Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *J. Bacteriol.* **182**: 1748-1753.
- Riely, B.K., Ané, J.M., Penmetza, R.V. & Cook, D.R. 2004. Genetic and genomic analysis in model legumes bring Nod-factor signalling to center stage. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 1-6.
- Rigaud, J., & Puppo, A. 1975. Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Bacteriol.* **88**: 223-228.
- Roche, P., Maillet, F., Plazanet, C., Debelle, F., Ferro, M., Truchet, G., Promé, J.C. & Dénairé, J. 1996. The common *nodABC* genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 15305-15310.

- Rodríguez-Navarro, D.N., Dardanelli, M.S. & Ruiz-Sainz, J.E. 2007. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS. Microbiol. Lett.* **272**: 127-136.
- Rodríguez-Navarro, D.N., Ruiz-Sainz, J.E., Buendía-Clavería, A.M., Santamaría, C., Balatti, P.A., Krishnan, H.B. & Pueppke, S.G. 1996. Characterization of fast-growing rhizobia from nodulated soybean (*Glycine max.* L. Merr.) in Vietnam. *System Appl Microbiol* **19**: 240-248.
- Rossen, L., Shearman, C. A., Johnston, A. W. B. & Downie, J. A. 1985. The *nodD* gene of *R. leguminosarum* is autoregulatory and in the presence of plant exudates induces the *nodA*, *B*, *C* genes. *EMBO J.* **4**: 3369-3373.
- Roth, L.E., Jeon, K. & Stacey, G. 1988. Homology in endosymbiotic system: the term symbiosome. En: *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Palacios, R., & Verma, D.P.S. (eds.), pp.: 220-225. American Phytopathological Society Press, St. Paul.
- Rudnick, P.A., Arcondéguy, T., Kennedy, C. K. & Kahn, D. 2001. *glnD* and *mviN* are genes of an essential operon in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **183** (8): 2682-2685.
- Sadowsky, M.J. & Graham, P.H. 1998. Soil biology of the Rhizobiaceae. En: *The Rhizobiaceae*. Spaink, H.P, Kondorosi, A. y Hooykaas, P.J.J. (eds.), pp. 155-172. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
- Saier, M.H. 2004. Evolution of bacterial type III protein secretion systems. *Trends. Microbiol.* **12**: 113-115.
- Saiki, R.K. 1990. Amplification of genomic DNA. En *PCR Protocols. A guide of methods and applications*, pp. 13-20. Editores: M. A. Innis, D. H. Ge White. Academic Press Inc., San Diego, California (EEUU).
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbord, Cold Spring Harbord Laboratory Press. New York. EE.UU.
- Sánchez-Contreras, M., Bauer, W.D., Gao, M.S., Robinson, J.B. & Downie, J.A. 2007. Quorum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interaction with legumes. *Philos. T. Roy. Soc. B.* **362**: 1149-1163.
- Sanjuán, J., Grob, P., Göttfert, H.H. & Stacey, G. 1994. NodW is essential for full expression of the common nodulation genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant-Microbe Interact* **7**: 364-369.
- Sawada, H., Kuykendall, L. D., & Young, J. M. 2003. Changing concepts in the systematic of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **49**:155-179.
- Schaechter, M. 2001. *Escherichia coli* and *Salmonella* 2000: the view from here. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 119-130.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. & Puhler, A. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene.* **145**: 69-73.
- Scheidle, H., Gross, A. & Niehaus, K. 2005. The lipid A substructure of the *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides is sufficient to suppress the oxidative burst in host plants. *New Phytol.* **165**: 559-565.
- Schell, M.A. 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 597-626.

## Bibliografía

- Schlaman, H.R.M., Horvath, B., Vijgenboom, E., Okker, R.J.H. & Lugtenberg, B.J.J. 1991. Suppression of nodulation gene expression in bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. *J. Bacteriol.* **173**: 4277-4287.
- Schlaman, H.R.M., Okker, R.J. & Lugtenberg, B.J.J. 1992. Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia. *J. Bacteriol.* **174**: 5177- 5182.
- Schlaman, H.R.M., Olsthoorn, M.M.A., Harteveld, M., Dörner, L., Djordjevic, M.A., Thomas-Oates, J.E. & Spaink, H.P. 2006. The production of species-specific highly unsaturated fatty acyl-containing LCOs from *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii is stringently regulated by *nodD* and involves the *nodRL* genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**: 215-226.
- Schlaman, H.R.M., Phillips, D.A. & Kondorosi, E. 1998. Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. En: *The Rhizobiaceae, The Molecular Biology of Model Plant Associated Bacteria*. Spaink, H.P., Kondorosi, A. & Hooykaas, H.J.J. (eds.), pp.: 371-380. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Schlüter, A., Nöhlen, M., Krämer, M., Defez, R. & Priefer, U.B. 2000. The *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae *glnD* gene, encoding a uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme, is expressed in the root nodule but is not essential for nitrogen fixation. *Microbiol.* **146**: 2987-2996.
- Schlüter, J.P., Reinkensmeier, J., Daschkey, S., Evguenieva-Hackenberg, E., Janssen, S., Jänicke, S., Becker, J.D., Giegerich, R. & Becker, A. 2010. A genome-wide survey of sRNAs in the symbiotic nitrogen-fixing alpha-proteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *BMC Genomics*.**11**: 245.
- Schultze, M., Quietlet-Sire, B., Kondorosi, E., Virelizier, H., Glushka, J.N., Endre, G., Géro, S.D. & Kondorosi, A. 1992. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulphated lipooligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 192-196.
- Schultze, M., Kondorosi, E., Ratet, P., Buiré, M. & Kondorosi, A. 1994. Cell and molecular biology of *Rhizobium*-plant interactions. *Int. Rev. Cytol.* **156**: 1-75.
- Schwyn, B. & Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**: 46-56.
- Shamseldin, A. 2007. Plasmid content of salt stress-tolerant *Rhizobium* strains from Egyptian soils nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 1603-1606.
- Shelton, H.M. & Brewbaker, J.L. 1994. *Leucaena leucocephala* – the most widely used forage tree legume. En: *Forage tree legumes in tropical agriculture*. Gutteridge, R.C., Shelton, H.M. (eds.), pp.: 15-29. CAB International, Wallingford (United Kingdom).
- Shelton, H.M., Franzel, S. & Peters, M. 2005. Adoption of tropical legume technology around the world: analysis of success. *Trop. Grasslands.* **39**: 198-209.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, H. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrilamide gels. *Anal. Chem.* **68**: 850-858.
- Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. 1983. Vector plasmids for *in vivo* and *in vitro* manipulations of Gram-negative bacteria. En: *Molecular genetics of the bacteria-plant interaction*. Pühler, A. (Ed.), pp. 98-106. Berlín: Springer-Verlag.

- Sindhu, S.S., Brewin, N.J., & Kannenberg, E.L.** 1990. Immunochemical analysis of lipopolysaccharides from free-living and endosymbiotic forms of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* **172**: 1804-1813.
- Singh, K.N & Chatrath, R.** 2001. Distribution of Saline Soils. En: *Application of Physiology in Wheat Breeding*. Reynolds, M.P., Ortíz-Monasterio, J.I. & McNab, A. (eds.), pp.:101-110. CIMMYT, México D.F.
- Skorupska, A., Janczarek, M., Marczak, M., Mazur, A. & Krol, J.** 2006. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microb. Cell. Fact.* **5**: 7-26.
- Smit, G., Kijne, J.W. & Lugtenberg, B.J.** 1987. Involvement of both cellulose fibrils and a Ca<sup>2+</sup> dependent adhesion in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root air tips. *J. Bacteriol.* **169**: 4294-4301.
- Soria-Díaz, M.E., Rodríguez-Carvajal, M.A., Tejero-Mateo, P., Espartero, J.L., Morón, B., Sousa, C., Megías, M., Thomas-Oates, J. & Gil-Serrano, A.M.** 2006. Structural determination of the Nod factors produced by *Rhizobium gallicum* bv. *gallicum* R592. *FEMS. Microbiol. Let.* **255**: 164-173.
- Soto, M.J., Sanjuán, J. & Olivares, J.** 2006. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology.* **152**: 3167-3174.
- Sousa, C., Folch, J.R., Boloix, P., Megías, M., Nava, N. & Quinto, C.** 1993. A *Rhizobium tropici* DNA región carrying the amino-terminal half of a *nodD* gene and a nod-box-like sequence confers host-range extension. *Mol. Microbiol.* **9**: 1157-1168.
- Southern, E.M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Spaink, H.P.** 1992. Rhizobial lipo-oligosaccharides: answers and questions. *Plant Mol. Biol.* **20**: 977-986.
- Spaink, H.P.** 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 257-288.
- Spaink, H.P., Aarts, A., Stacey, G., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J. & Kennedy, E.P.** 1992. Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Nod metabolites using thin-layer chromatography. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**: 72-80.
- Spaink, H.P., Wijffelman, C.A., Okker, R.J.H. & Lugtenberg, B.J.J.** 1989. Localization of functional regions of the *Rhizobium nodD* product using hybrid *nod* genes. *Plant Mol. Biol.* **12**: 59-73..
- Spaink, H.P., Wijffelman, C.A., Pees, E., Okker, R.J.H. & Lugtenberg, B.J.J.** 1987. *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature* **328**: 337-340.
- Sprent, J.** 2001. Nodulation in legumes. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Stahelin, C., Forsberg, L.S., D'Haese, W., Gao, M-Y., Carlson, R.W., Xie, Z-P., Pellock, B.J. & Jones, K.M.** 2006. Exo-oligosaccharides of *Rhizobium* sp. are required for symbiosis with various legumes. *J. Bacteriol.* **188**: 6168-6178.
- Stanfield, S.W., Ielpi, L., O'Brochta, D., Helinski, D.R. & Ditta, G.S.** 1988. The *ndvA* gene product of *Rhizobium meliloti* is required for beta-(1→2) glucan production and has homology to the ATP-binding export protein HlyB. *J. Bacteriol.* **170**: 3523-3530.

## Bibliografía

- Szeto, W.W., Nixon, B.T., Ronson, C.W. & Ausubel, F.M. 1987. Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti ntrC* gene: *R. meliloti* has separate regulatory pathways for activating nitrogen fixation genes in free-living versus symbiotic cells. *J. Bacteriol.* **169**: 1423-1432.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 1991. Plant Physiology. En: *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G., Burris, R.H. y Evans, H.J. (eds.). Chapman and Hall. New York.
- Tejera, N.A., Campos, R., Sanjuán, J. & Lluch, C. 2004. Nitrogenase and antioxidant enzyme activities in *Phaseolus vulgaris* nodules formed by *Rhizobium tropici* isogenic strains with varying tolerance to salt stress. *J. Plant Physiol.* **161**: 329-338.
- Thanassi, D.G. & Hultgren, S.J. 2000. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **12**: 420-430.
- Thurston, G., Regan, S., Rampitsch, C. & Xing, T. 2005. Proteomic and phosphoproteomic approaches to understand plant-pathogen interactions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **66**: 3-11.
- Timmers, A.C., Soupéne, E., Auriac, M.C., de Billy, F., Vasse, J., Boistard, & P. Truchet, G. 2000. Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 1204-1213.
- Tohme, J., González, D.O., Beebe, S. & Duque, M.C. 1995. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop Sci.* **36**: 1375-1384.
- Tu, J.C. 1981. Effect of salinity on *Rhizobium*-root-hair interaction, nodulation and growth of soybean. *Can. J. Plant Sci.* **61**: 231-239.
- Udvardi, M.K. & Day, D.A. 1997. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 493-523.
- van Brussel, A.A.N., Recourt, K., Pees, E., Spaink, H., Tak, T., Wijffelman, C.A., Kijne, J.W. & Lugtenberg, B.J.J. 1990. A biovar-specific signal of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae induces increased nodulation gene-inducing activity in root exudates of *Vicia sativa* subsp. nigra. *J. Bacteriol.* **172**: 5394-5401.
- Vance, C.P. 1998. Legume symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects. En: *The Rhizobiaceae, The Molecular Biology of Model Plant Associated Bacteria*. Spaink, H.P., Kondorosi, A. & Hooykaas, P.J.J. (eds.), pp.: 509-530. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Vance, C.P. 2002. Root-bacteria interactions: symbiotic nitrogen fixation. En: *Plant roots: The Hidden Half*. Waisel, Y., Eshel, A. & Kafkati, U. (eds.), pp.: 839-867. Marcel Dekker Publishers, New York.
- Vance, C.P., Graham, P.H. & Allan, D.L. 2000. Biological nitrogen fixation. Phosphorus: a critical future need. En: *Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity*. Pedrosa, F.O., Hungria, M., Yates, M.G. & Newton, W.E. (eds.), pp.: 506-514. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Van Dommelen, A., Keijers, V., Somers, E. & Vanderleyden, J. 2002. Cloning and characterization of the *Azospirillum brasilense glnD* gene and analysis of a *glnD* mutant. *Mol. Genet. Genomics.* **266**: 813- 820.
- van Heeswijk, W.C., Kuppinger, O., Merrick, M. & Kahn, D. 1992. Localization of the *glnD* gene on a revised map of the 200-kilobase region of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.* **174**: 1702-1703.

- van Rhijn, P., Desair, J., Vlassak, K. & Vanderleyden, J. 1994. Funcional analysis of *nodD* genes of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**: 666-677.
- van Rhijn, P. J., Feys, B., Verreth, C. & Vanderleyden, J. 1993. Multiple copies of *nodD* in *Rhizobium tropici* CIAT 899 and BR796. *J. Bacteriol.* **175**: 438-447.
- van Rhijn, P. & Vanderleyden, J. 1995. The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* **59**:124-142.
- Vargas, A.A.T. & Graham, P.H. 1988. Cultivars and pH effects on competition for nodule sites between isolates of *Rhizobium* in beans. *Plant Soil.* **117**: 195-200.
- Vargas, C., Martínez, L.J., Megías, M. & Quinto, C. 1990. Identification and cloning of nodulation genes and host specificity determinants of the broad host-range *Rhizobium leguminosarum* biovar pahaseoli strain CIAT899. *Mol. Microbiol.* **4**: 1899-1910.
- Vinardell, J. M., Espuny, M. R., Ivanov, K., Ollero, F. J., Madinabeitia, N., Medina, C., Bellogín, R. A., Cubo, T., Buendía-Clavería, A., Gutiérrez, R., Hidalgo, A. & Ruiz-Sainz, J. E. 2002. Caracterización del gen *nolR* de *Sinorhizobium fredii* HH103. En: IX Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno, p.: 49. Universidad de Córdoba, España.
- Vinardell, J.M., López-Baena, F.J., Hidalgo, A., Ollero, F.J., Bellogín, R., Espuny, M.R., Temprano, F., Romero, F., Krishnan, H.B., Pueppke, S.G. & Ruiz-Sainz, J.E. 2004. The effect of FITA mutations on the symbiotic properties of *S. fredii* varies in a chromosomal-background-dependent manner. *Arch. Microbiol.* **181**:144-154.
- Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. *Blackwell Scientific Publication*. Oxford, Great Britain.
- Vinuesa, P., Neumann-Silkow, F., Pacios-Bras, C., Spaink, H.P., Martínez-Romero, E. & Werner, D. 2003. Genetic análisis of pH-regulated operon from *Rhizobium tropici* CIAT899 involved in acid tolerance and nodulation competitiveness. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**: 159-168.
- Vinuesa, P., Reuhs, B.L., Breton, C. & Werner, D. 1999. Identification of a plasmid-borne locus in *Rhizobium etli* KIM5s involved in lipopolysaccharide O-chain biosynthesis and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *J. Bacteriol.* **181**: 5606-5614.
- Vlassak, K., Vanderleyden, J. & Franco, A. 1996. Competition and persistence of *Rhizobium tropici* and *Rhizobium etli* in tropical soil during successive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultures. *Biol. Fertil. Soils.* **21**: 61-68.
- von Bodman, S.B., Bauer, W.D. & Coplin, D.L. 2003. Quorum sensing in plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**: 455-482.
- Wais, R.J., Galera, C., Oldroyd, G., Catoira, R., Varma Penmetsa, R., Cook, D., Gough, C., Dénarié, J. & Long, S.R. 2000. Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* **97**: 13407-13412.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E. & Vivanco, J.M. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* **132**: 44-51.
- Wang, E.T., Martínez-Romero, J. & E. Martínez-Romero. 1999. Genetic diversity of *Rhizobium* from *Leucaena leucocephala* nodules in Mexican soils. *Mol. Ecol.* **8**:711-724.

## Bibliografía

- Wang, S.P. & Stacey, G. 1990. Ammonia regulation of *nod* genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Gen. Genet.* **223**: 329-331.
- Wassem, R., Kobayashi, H., Kambara, K., Le Quere, A., Walker, G.C., Broughton, W.J. & Deakin, W.J. 2008. TtsI regulates symbiotic genes in *Rhizobium* species NGR234 by binding to *tts* boxes. *Mol Microbiol.* **68**: 736-748.
- Weir, B.S. 2011. *The current taxonomy of rhizobia*. New Zealand rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>. Last updated: March, 2011.
- Werner, D. 1992. *Symbiosis of Plants and Microbes*. Chapman & Hall, University Press, Cambridge.
- Whitfield, C. & Valvano, M.A. 1993. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in Gram-negative bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **35**: 135-246.
- Wilkins, M.R. 2009. Proteomics data mining. *Expert Rev. Proteomics.* **6**: 599- 603.
- Willems, A. 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil* **287**: 3-14.
- Yamaguchi, T. & Blumwald, E. 2005. Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends Plant Sci.* **10**: 615-620.
- Yelton, M.M., Yang, S.S., Edie, S.A. & Lim, S.T. 1983. Characterization of an effective salt-tolerant, fast growing strain of *Rhizobium japonicum*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1537-1547.
- Yurgel, S.N. & Kahn, M.L. 2008. A mutant GlnD nitrogen sensor protein leads to a nitrogen-fixing but ineffective *Sinorhizobium meliloti* symbiosis with alfalfa. *PNAS.* **105**: 18958-18963.
- Zahran, H.H. 1991. Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline environments. *Biol. Fertil. Soils.* **12**: 73-80.
- Zahran, H.H. 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 968-989.
- Zhang, Y., Pohlmann, E.L., Serate, J., Conrad, M.C. & Roberts, G. 2010. Mutagenesis and functional characterization of the four domains of GlnD, a bifunctional nitrogen sensor protein. *J. Bacteriol.* **192**: 2711-2721.
- Zhu, J. 2001. Plant salt tolerance. *Trends. Plant. Sci.* **6**: 66-71.
- Zurdo-Piñero, J.L., Velázquez, E., Lorite, M.J., Brelles-Mariño, G., Schröder, E.C., Bedmar, E.J., Mateos, P.F. & Martínez-Molina, E. 2004. Identification of fast-growing rhizobia nodulating tropical legumes from Puerto Rico as *Rhizobium gallicum* and *Rhizobium tropici*. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**: 469-477.

## *Apéndice*

---



**TABLAS DE FACTORES NOD**

La estructura de los factores Nod se describe indicando con números romanos el número de unidades de GlcNAc que forman el esqueleto de las moléculas. Entre paréntesis se indica la longitud y grado de insaturación del ácido graso unido al extremo no reductor y los distintos sustituyentes ordenados según aparecen en la molécula en sentido horario desde la posición del ácido graso (Spaink, 1992). Ac, grupo acetilo; Cb, grupo carbamoilo; Fuc, grupo fucosilo; Hex, hexosa; Man, manosa; Me, grupo metilo; MeFuc, grupo metilfucosilo, NMe, grupo *N*-metilo, S, grupo sulfato.

\*Tipos de sustituyentes de los factores Nod; **tipo 1**: sin sustituyentes, **tipo 2**: grupo sulfato, **tipo 3**: *N*-metilo, **tipo 4**: manosa, **tipo 5**: grupo fucosilo o metilfucosilo, **tipo 6**: grupo acetilo o grupo carbamoilo; **tipo 7**: hexosa en el extremo reductor del esqueleto, y **tipo 8**: factores sin *N*-acetilo en alguna GlcNAc del esqueleto.

**Tabla I.-** Factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 en medio mínimo B<sup>-</sup> con apigenina en condiciones control y de estrés salino (NaCl 300 mM) (tomado de Estévez *et al.*, 2009).

Estructura	Tipo *	[M+Na] <sup>+</sup> ( <i>m/z</i> )	Iones B <sub>n</sub>	
			Apigenina y NaCl 300 mM	Apigenina
IV (C <sub>14:0</sub> )	1	1021	394, 597, 800	
IV (C <sub>14:0</sub> , NMe)	3	1035	+	
IV (C <sub>16:0</sub> )	1	1049	-, 625, -	+
IV (C <sub>16:0</sub> , NMe)	3	1063	436, 639, 842	+
IV (C <sub>18:1</sub> )	1	1075	448, 651, 854	+
IV (C <sub>18:0</sub> )	1	1077	450, 653, 856	
IV(C <sub>18:1</sub> , NMe)	3	1089	462,665,868	462, 665, 868
IV(C <sub>18:0</sub> , NMe)	3	1091	464, - , 870	
IV(C <sub>18:0</sub> -OH)	1	1093	466, 669, 872	
IV(C <sub>20:0</sub> -OH)	1	1121	494, 697, 900	
V(C <sub>20:0</sub> -OH, NMe)	3	1135	508, - , -	
IV(C <sub>18:0</sub> -OH, NMe, Ac)	3,6	1149		522, 725, 928
IV-Man (C <sub>12:0</sub> , NMe)	3,4	1169		380, 583, 786, 989
IV-Man (C <sub>10:0</sub> -OH, Cb)	4,6	1186		397, 600, 803, 1006
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	2,3	1191	462, 665, 868, 1071	
IV (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	2,3	1193	464, 667, 870	+
IV (C <sub>20:1</sub> , S)	2	1205		476, 679, 882
V (C <sub>12:0</sub> , NMe)	3	1210	380, 583, 786, 989	380, 583, 786, 989
V(C <sub>14:0</sub> )	1	1224	394, 597, 800, 1003	394, 597, 800, 1003
IV (C <sub>18:1</sub> , Fuc)	5	1221	-, 651, 854	

## Apéndice

Tabla I.- Continuación

Estructura	Tipo *	[M+Na] <sup>+</sup> (m/z)	Iones B <sub>n</sub>	
			Apigenina y NaCl 300 mM	Apigenina
V(C <sub>10:0</sub> -OH, Cb)	6	1227		397, 600, 803, 1006
IV (C <sub>18:1</sub> , MeFuc)	5	1235	-, 651, 854	
IV (C <sub>20:0</sub> -OH, NMe, S)	2,3	1237	508, 711, 914, 1219	
IV-Man (C <sub>18:1</sub> )	4	1237	-, 651, 854, 1057	
V (C <sub>14:0</sub> , NMe)	3	1238	408, 611, -, -	+
V(C <sub>10:0</sub> -OH, NMe, Cb)	3,6	1241		411, 614, 817, 1020
IV-Man (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3,4	1251		462, 665, 868, 1071
V (C <sub>16:0</sub> )	1	1252	422, -, -, 1031	
V (C <sub>16:1</sub> , NMe)	3	1264	-, -, 840, 1043	
V (C <sub>16:0</sub> , NMe )	3	1266	436, 639, 842, 1045	436, 639, 842, 1045
V(C <sub>18:1</sub> )	1	1278	448, 651, 854, 1057	
V(C <sub>18:0</sub> ) / V(C <sub>16:1</sub> -OH, NMe)	1 / 3	1280	+	
V (C <sub>18:1</sub> , NMe )	3	1292	462, 665, 868, 1071	+
V (C <sub>18:0</sub> , NMe )	3	1294	464, 667, 870, 1073	+
V(C <sub>18:0</sub> -OH)	1	1296	466, 669, 872, 1075	
V(C <sub>20:1</sub> )	1	1306		476, 679, 882, 1085
V(C <sub>20:0</sub> )	1	1308	+	478, 681, 884, 1087
V(C <sub>18:0</sub> -OH, NMe)	3	1310	480, 683, 886, -	
V(C <sub>20:1</sub> , NMe)	3	1320	490, 693, 896, 1099	
V (C <sub>20:0</sub> , NMe )	3	1322		492, 695, 898, 1108
V(C <sub>20:0</sub> -OH)	1	1324	494, 697, 900, 1103	
V(C <sub>22:1</sub> ) / V(C <sub>18:1</sub> , NMe, Ac)	1 / 3,6	1334		+
V (C <sub>20:1</sub> -OH, NMe)	3	1336		506, 709, 912, 1115
V(C <sub>20:0</sub> -OH, NMe)	3	1338	508, 711, 914, 1117	
V (C <sub>16:0</sub> , S)	2	1354	-, 625, 828, 1031	
V(C <sub>20:0</sub> -OH, Ac)/ V (C <sub>22:0</sub> -OH, NMe)	6 / 3	1366		+
V (C <sub>16:1</sub> , NMe, S)	2,3	1366		+
V (C <sub>16:0</sub> , NMe, S)	2,3	1368	-, -, 842, 1045	
V (C <sub>18:0</sub> , S)	2	1382	-, 653, 856, 1059	

Tabla I.- Continuación

Estructura	Tipo *	[M+Na] <sup>+</sup> (m/z)	Iones B <sub>n</sub>	
			Apigenina y NaCl 300 mM	Apigenina
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	2,3	1394	462, 665, 868, 1071	462, 665, 868, 1071
V (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	2,3	1396	464, 667, 870, 1073	+
V (C <sub>20:1</sub> , S)	2	1408	476, 679, 882, 1085	476, 679, 882, 1085
V (C <sub>20:0</sub> , S)	2	1410	-, 681, 884, 1087	+
V(C <sub>18:0-OH</sub> , NMe, S)	2,3	1412	480, 683, 886, 1089, 1394	
V (C <sub>20:1</sub> , NMe, S)	2,3	1422	490, -, 869, 1099	
V (C <sub>20:0</sub> , NMe, S)	2,3	1424	492, 695, 898, 1101	
V(C <sub>22:1</sub> , S) / V(C <sub>18:1</sub> , NMe, Ac, S)	2 / 2,3,6	1436	504, 707, 910, 1113	
V (C <sub>18:1</sub> , MeFuc)	5	1438	504, 707, 910, 1113	
V (C <sub>20:0-OH</sub> , NMe, S)	2,3	1440	448, 651, 854, 1057	
V (C <sub>16:1</sub> , NMe, S, S)	2,3	1468	536, 739, 942, 1145	

Tabla II.- Factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 en medio mínimo B<sup>-</sup> con y sin NaCl 300 mM, en ausencia de apigenina.

Fuentes: <sup>(a)</sup> Estévez, J. Tesis Doctoral, 2007. <sup>(b)</sup> Datos cedidos por el Profesor Manuel Megías.

Estructura	Tipo*	[M+2H] <sup>2+</sup> (m/z)	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Iones B <sub>n</sub>	Sin NaCl <sup>(b)</sup>	NaCl 300 mM <sup>(a)</sup>
II-Hex (C <sub>18:1</sub> )	7		809	426, 629, 791		+
III (C <sub>16:0</sub> )	1		824	400, 603, 806		+
III (C <sub>16:0</sub> , NMe)	3		838	414, 617, 820	+	+
III (C <sub>18:1</sub> )	1		850	426, 629, 832	+	+
III (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3		864	440, 643, 846	+	+
III (C <sub>18:0-OH</sub> )	1		868	444, 647, 850		+
III (C <sub>18:0-OH</sub> , NMe)	3		882	458, 661, 864		+
III (C <sub>22:3</sub> , NMe)	3		916	492, 695, 898		+
III (C <sub>18:1</sub> , dNAc)	8		1011	426, 587, 790	+	
III-Hex (C <sub>18:1</sub> )	7		1012	426, 629, 832, 994		+
III-Hex (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3,7		1026	440, 643, 846, 1008		+
III-Hex (C <sub>18:0-OH</sub> , NMe)	3,7		1044	458, 661, 864, 1026		+

## Apéndice

Tabla II.- Continuación

Estructura	Tipo*	[M+2H] <sup>2+</sup> (m/z)	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Iones B <sub>n</sub>	Sin NaCl <sup>(b)</sup>	NaCl 300 mM <sup>(a)</sup>
IV (C <sub>14:0</sub> )	1		999	372, 575, 778, 981		+
IV (C <sub>14:0</sub> , NMe)	3		1013	386, 589, 792, 995		+
IV (C <sub>16:1</sub> )	1		1025	398, 601, 804, 1007		+
IV (C <sub>16:0</sub> )	1		1027	400, 603, 806, 1009		+
IV (C <sub>16:1</sub> , NMe)	3		1039	412, 615, 818, 1021		+
IV (C <sub>16:0</sub> , NMe)	3		1041	414, 617, 820, 1023		+
IV (C <sub>18:1</sub> )	1		1053	426, 629, 832, 1035	+	+
IV (C <sub>18:0</sub> )	1		1055	428, 631, 834, 1037	+	+
IV (C <sub>16:0-OH</sub> , NMe)	3		1057	430, 633, 836, 1039		+
IV (C <sub>18:2</sub> , NMe)	3		1066	438, 641, 844, 1048		+
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3		1067	440, 643, 846, 1049		+
IV (C <sub>18:0</sub> , NMe)	3		1069	442, 645, 848, 1051		+
IV (C <sub>18:0-OH</sub> , NMe)	3		1085	458, 661, 864, 1067		+
IV (C <sub>20:0</sub> , NMe)	3		1097	470, 673, 876, 1079		+
IV (C <sub>22:3</sub> , NMe)	3		1119	492, 695, 898, 1101		+
IV (C <sub>18:1</sub> , S)	2		1133	426, 629, 832 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1053		+
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	2,3		1147	440, 643, 846 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1067		+
IV (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	2,3		1149	442, 645, 848, 1131 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> = 1069		+
IV-Hex (C <sub>14:0</sub> )	7		1161	372, 575, 778, 981, 1143		+
IV-Hex (C <sub>14:0</sub> , NMe)	3,7		1175	386, 589, 792, 995, 1157		+
IV (C <sub>20:0</sub> , NMe, S)	2,3		1177	470, 673, 876, 1159 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> = 1097		+
IV (C <sub>20:0</sub> )	1	542.22		456, -, 862		+
IV (C <sub>20:1</sub> , NMe, S)	2,3	588.6		468, 671, 874		+
V (C <sub>14:0</sub> )	1		1202	372, 575, 778, 981, 1184		+
V (C <sub>18:1</sub> , dNAc)	8		1214	426, 629, 832, 993	+	
V (C <sub>14:1</sub> , NMe)	3		1214	384, 587, 790, 993, 1196		+
V (C <sub>14:0</sub> , NMe)	3		1216	386, 589, 792, 995, 1198		+
V (C <sub>16:0</sub> )	1	615.84		400, 603, 806, 1009		+
V (C <sub>16:1</sub> )	1		1228	398, 601, 804, 1007, 1210		+
IV-Hex (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3,7		1229	440, 643, 846, 1049, 1211		+

Tabla II.- Continuación

Estructura	Tipo*	[M+2H] <sup>2+</sup> (m/z)	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Iones B <sub>n</sub>	Sin NaCl <sup>(b)</sup>	NaCl 300 mM <sup>(a)</sup>
V (C <sub>16:0</sub> , NMe)	3		1244	414, 617, 820, 1023, 1226		+
V (C <sub>18:1</sub> )	1		1256	426, 629, 832, 1035, 1238	+	+
V (C <sub>18:0</sub> )	1		1258	428, 631, 834, 1037, 1240		+
V (C <sub>16:1</sub> , NMe)	3	621.86		412, 615, 818, 1021, 1224		+
V (C <sub>18:2</sub> , NMe)	3		1268	438, 641, 844, 1047, 1250		+
V (C <sub>18:1</sub> , NMe)	3		1270	440, 643, 846, 1049, 1252	+	+
V (C <sub>18:0</sub> , NMe)	3		1272	442, 645, 848, 1051, 1254		+
IV-Hex (C <sub>22:3</sub> , NMe)	3,7		1281	492, 695, 898, 1101, 1263		+
V (C <sub>20:1</sub> )	1		1284	454, 657, 860, 1063, 1266		+
V (C <sub>20:0</sub> )	1		1286	456, 659, 862, 1065, 1268		+
V (C <sub>20:1</sub> , NMe)	3		1298	468, 671, 874, 1077, 1280		+
V (C <sub>16:0</sub> , S)	2		1310	400, 603, 806, 1009, 1292		+
V (C <sub>18:0-OH</sub> )	1	638.09		444, -, 850, 1053		+
V (C <sub>20:0</sub> , NMe)	3	650.85		470, 673, 876		+
V (C <sub>20:0</sub> , S)	2	684.29		456, -, 862, 1065		+
V (C <sub>22:3</sub> , NMe)	3		1322	492, 695, 898, 1101, 1304		+
V (C <sub>16:0</sub> , NMe, S)	2,3		1324	414, 617, 820, 1023 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> = 1244		+
V (C <sub>18:1</sub> , S)	2		1336	426, 629, 832, 1035, 1318		+
V (C <sub>22:0-OH</sub> , NMe)	3		1344	514, 717, 920, 1123, 1326		+
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	2,3		1350	440, 643, 846, 1049, 1332 <sup>a</sup> [B5-80] <sup>+</sup> = 1252		+
V (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)	2,3		1352	442, 645, 848, 1051, 1334 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> = 1272		+
V (C <sub>20:1</sub> , NMe, S)	2,3		1378	468, 671, 874, 1077, 1360 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> = 1298		+
V (C <sub>20:0</sub> , NMe, S)	2,3		1380	470, 673, 876, 1079, 1362		+

<sup>a</sup>[M-80]<sup>+</sup> o [B5-80]<sup>+</sup> = Pérdida de grupo sulfato

**Tabla III.-** Tabla comparativa de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 y el mutante C8 en medio mínimo B<sup>-</sup> en condiciones control, con apigenina y con NaCl 300 mM.

Fuentes: <sup>(a)</sup> Esta Tesis. <sup>(b)</sup> Estévez *et al.*, 2009. <sup>(c)</sup> Estévez, J. Tesis Doctoral, 2007. <sup>(d)</sup> Datos cedidos por el Profesor Manuel Megías.

Estructura	CIAT899			C8		
	B <sup>-</sup> <sup>(d)</sup>	Apigenina <sup>(b)</sup>	NaCl 300 mM <sup>(c)</sup>	B <sup>-</sup> <sup>(a)</sup>	Apigenina <sup>(a)</sup>	NaCl 300 mM <sup>(a)</sup>
II-Hex (C <sub>18:1</sub> )			+			
III (C <sub>16:0</sub> )			+			
III (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+		+			
III (C <sub>18:1</sub> )	+		+	+	+	
III (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+		+	+		
III (C <sub>18:1</sub> , dNAc)	+					
III (C <sub>18:0</sub> -OH)			+			
III (C <sub>18:0</sub> -OH, NMe)			+			
III (C <sub>22:3</sub> , NMe)			+			
III-Hex (C <sub>18:1</sub> )			+			
III-Hex (C <sub>18:1</sub> , NMe)			+			
III-Hex (C <sub>18:0</sub> -OH, NMe)			+			
IV (C <sub>14:0</sub> )			+			
IV (C <sub>14:0</sub> , NMe)			+			
IV (C <sub>16:1</sub> )			+			
IV (C <sub>16:0</sub> )		+	+		+	+
IV (C <sub>16:1</sub> , NMe)			+			
IV (C <sub>16:0</sub> , NMe)		+	+			
IV (C <sub>18:1</sub> )	+	+	+	+	+	+
IV (C <sub>18:0</sub> )	+		+			
IV (C <sub>16:0</sub> -OH, NMe)			+			
IV (C <sub>18:2</sub> , NMe)			+			
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe)		+	+		+	
IV (C <sub>18:0</sub> , NMe)			+			
IV (C <sub>18:0</sub> -OH, NMe)			+			
IV (C <sub>18:0</sub> -OH, NMe, Ac)		+				
IV-Man (C <sub>12:0</sub> , NMe)		+				
IV-Man (C <sub>10:0</sub> -OH, Cb)		+				
IV (C <sub>20:0</sub> , NMe)			+			
IV (C <sub>22:3</sub> , NMe)			+			
IV (C <sub>18:1</sub> , S)			+			

Tabla III.- Continuación

Estructura	CIAT899			C8		
	B <sup>-</sup> (d)	Apigenina (b)	NaCl 300 mM (c)	B <sup>-</sup> (a)	Apigenina (a)	NaCl 300 mM (a)
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)			+			
IV (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)		+	+			
IV (C <sub>20:1</sub> , S)		+				
IV-Hex (C <sub>14:0</sub> )			+			
IV-Hex (C <sub>14:0</sub> , NMe)			+			
IV (C <sub>20:0</sub> , NMe, S)			+			
IV (C <sub>20:0</sub> )			+			
IV (C <sub>20:1</sub> , NMe, S)			+			
V (C <sub>10:0-OH</sub> , Cb)		+				
V (C <sub>10:0-OH</sub> , NMe, Cb)		+				
V (C <sub>12:0</sub> , NMe)		+				
IV-Man (C <sub>18:1</sub> , NMe)		+				
V (C <sub>14:0</sub> )		+				
V (C <sub>14:1</sub> , NMe)			+			
V (C <sub>14:0</sub> , NMe)		+	+			
V (C <sub>16:0</sub> )			+		+	
V (C <sub>16:1</sub> )			+			
IV-Hex (C <sub>18:1</sub> , NMe)			+			
V (C <sub>16:0</sub> , NMe, dNAc)					+	
V (C <sub>16:0</sub> , NMe)		+	+		+	+
V (C <sub>18:1</sub> )	+		+	+	+	+
V (C <sub>18:0</sub> )			+			
V (C <sub>16:1</sub> , NMe)			+		+	
V (C <sub>18:2</sub> , NMe)			+			
V (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+	+		+	+
V (C <sub>18:1</sub> , dNAc)	+					
V (C <sub>18:0</sub> , NMe)		+	+			+
IV-Hex (C <sub>22:3</sub> , NMe)			+			
V (C <sub>20:1</sub> )		+	+			
V (C <sub>20:0</sub> )		+	+			
V (C <sub>20:0</sub> , NMe)		+				
V (C <sub>20:1</sub> , NMe)			+			
V (C <sub>20:1-OH</sub> , NMe)		+				

Tabla III.- Continuación

Estructura	CIAT899			C8		
	B <sup>-</sup> (d)	Apigenina (b)	NaCl 300 mM (c)	B <sup>-</sup> (a)	Apigenina (a)	NaCl 300 mM (a)
V (C <sub>20:1</sub> , S)		+				
V (C <sub>20:0</sub> , S)		+	+			
V (C <sub>22:3</sub> , NMe)			+			
V (C <sub>16:1</sub> , NMe, S)		+				
V (C <sub>16:0</sub> , NMe, S)			+			
V (C <sub>18:1</sub> , S)			+			
V (C <sub>20:0</sub> -OH, Ac) / V (C <sub>22:0</sub> -OH, NMe)		+	+			
V (C <sub>22:1</sub> ) / V (C <sub>18:1</sub> , NMe, Ac)		+				
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)		+	+		+	
V (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)		+	+			
V (C <sub>20:1</sub> , NMe, S)			+			
V (C <sub>20:0</sub> , NMe, S)			+			

Tabla IV.- Tabla comparativa de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 en medio mínimo B<sup>-</sup> con y sin glutamina en condiciones control (B<sup>-</sup>), con apigenina y con NaCl 300 mM.

Fuentes: (a) Esta Tesis. (b) Estévez *et al.*, 2009. (c) Estévez, J. Tesis Doctoral, 2007. (d) Datos cedidos por el Profesor Manuel Megías.

Estructura	Medio B <sup>-</sup>			Medio B <sup>-</sup> con glutamina		
	B <sup>-</sup> (d)	Apigenina (b)	NaCl 300 mM (c)	B <sup>-</sup> (a)	Apigenina (a)	NaCl 300 mM (a)
II-Hex (C <sub>18:1</sub> )			+			
III (C <sub>16:0</sub> )			+			
III (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+		+			
III (C <sub>18:1</sub> )	+		+	+	+	+
III (C <sub>18:0</sub> )					+	
III (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+		+		+	+
III (C <sub>18:1</sub> , dNAc)	+					
III (C <sub>18:0</sub> -OH)			+			
III (C <sub>18:0</sub> -OH, NMe)			+			
III (C <sub>22:3</sub> , NMe)			+			
III-Hex (C <sub>18:1</sub> )			+			

Tabla IV.- Continuación

Estructura	Medio B <sup>-</sup>			Medio B <sup>-</sup> con glutamina		
	B <sup>-</sup> (d)	Apigenina (b)	NaCl 300 mM (c)	B <sup>-</sup> (a)	Apigenina (a)	NaCl 300 mM (a)
III-Hex (C <sub>18:1</sub> , NMe)			+			
III-Hex (C <sub>18:0-OH</sub> , NMe)			+			
IV (C <sub>14:0</sub> )			+	+	+	+
IV (C <sub>14:0</sub> , NMe)			+		+	+
IV (C <sub>16:1</sub> )			+	+	+	+
IV (C <sub>16:0</sub> )		+	+	+	+	+
IV (C <sub>16:1</sub> , NMe)			+		+	+
IV (C <sub>16:0</sub> , NMe)		+	+		+	+
IV (C <sub>18:1</sub> )	+	+	+	+	+	+
IV (C <sub>18:0</sub> )	+		+	+	+	+
IV (C <sub>16:0-OH</sub> , NMe)			+			
IV (C <sub>18:2</sub> , NMe)			+			
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe)		+	+	+	+	+
IV (C <sub>18:0</sub> , NMe)			+			+
IV (C <sub>18:0-OH</sub> )					+	
IV (C <sub>18:0-OH</sub> , NMe)			+			
IV (C <sub>18:0-OH</sub> , NMe, Ac)		+				
IV-Man (C <sub>12:0</sub> , NMe)		+				
IV-Man (C <sub>10:0-OH</sub> , Cb)		+				
IV (C <sub>20:0</sub> , NMe)			+			
IV (C <sub>22:3</sub> , NMe)			+			
IV (C <sub>18:1</sub> , S)			+	+		
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)			+			+
IV (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)		+	+			+
IV (C <sub>20:1</sub> , S)		+				
IV-Hex (C <sub>14:0</sub> )			+			
IV-Hex (C <sub>14:0</sub> , NMe)			+			
IV (C <sub>20:0</sub> , NMe, S)			+			
IV (C <sub>20:0</sub> )			+			
IV (C <sub>20:1</sub> , NMe, S)			+			
V (C <sub>10:0-OH</sub> , Cb)		+				
V (C <sub>10:0-OH</sub> , NMe, Cb)		+				
V (C <sub>12:0</sub> , NMe)		+				

## Apéndice

Tabla IV.- Continuación

Estructura	Medio B <sup>-</sup>			Medio B <sup>-</sup> con glutamina		
	B <sup>-</sup> (d)	Apigenina (b)	NaCl 300 mM (c)	B <sup>-</sup> (a)	Apigenina (a)	NaCl 300 mM (a)
V (C <sub>14:0</sub> )		+			+	
V (C <sub>14:1</sub> , NMe)			+			
V (C <sub>14:0</sub> , NMe)		+	+		+	+
V (C <sub>16:0</sub> )			+		+	+
V (C <sub>16:1</sub> )			+			
IV-Hex (C <sub>18:1</sub> , NMe)			+			
V (C <sub>16:0</sub> , NMe, dNAc)						
V (C <sub>16:0</sub> , NMe)		+	+	+	+	+
V (C <sub>18:1</sub> )	+		+	+		
V (C <sub>18:0-OH</sub> )					+	
V (C <sub>18:0</sub> )			+			
V (C <sub>16:1</sub> , NMe, dNAc)						+
V (C <sub>16:0</sub> , NMe, dNAc)						+
V (C <sub>16:1</sub> , NMe)			+		+	+
V (C <sub>18:2</sub> , NMe)			+			
V (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+	+	+	+	+
V (C <sub>18:1</sub> , dNAc)	+					
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, dNAc)					+	+
V (C <sub>18:0</sub> , NMe)		+	+		+	+
IV-Hex (C <sub>22:3</sub> , NMe)			+			
V (C <sub>20:1</sub> )		+	+			
V (C <sub>20:0</sub> )		+	+			
V (C <sub>20:0</sub> , NMe)		+				
V (C <sub>20:1</sub> , NMe)			+			
V (C <sub>20:1-OH</sub> , NMe)		+				
V (C <sub>16:0</sub> , S)			+			
V (C <sub>20:1</sub> , S)		+				
V (C <sub>20:0</sub> , S)		+	+			
V (C <sub>22:3</sub> , NMe)			+			
V (C <sub>16:1</sub> , NMe, S)		+				
V (C <sub>16:0</sub> , NMe, S)			+		+	+
V (C <sub>18:1</sub> , S)			+	+	+	+

**Tabla IV.-** Continuación

Estructura	Medio B <sup>-</sup>		Medio B <sup>-</sup> con glutamina			
	B <sup>-</sup> (d)	Apigenina (b)	NaCl 300 mM (c)	B <sup>-</sup> (a)	Apigenina (a)	NaCl 300 mM (a)
V (C <sub>20:0</sub> -OH, Ac) / V (C <sub>22:0</sub> -OH, NMe)		+	+			
V (C <sub>22:1</sub> ) / V (C <sub>18:1</sub> , NMe, Ac)		+				
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)		+	+	+	+	+
V (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)		+	+		+	+
V (C <sub>20:1</sub> , NMe, S)			+			+
V (C <sub>20:0</sub> , NMe, S)			+			

**Tabla V.-** Tabla comparativa de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 y el mutante C8 en medio mínimo B<sup>-</sup> con glutamina en condiciones control (B<sup>-</sup>), con apigenina y con NaCl 300 mM.

Fuente: esta Tesis.

Estructura	CIAT899			C8		
	B <sup>-</sup>	Apigenina	NaCl 300 mM	B <sup>-</sup>	Apigenina	NaCl 300 mM
III (C <sub>18:1</sub> )	+	+	+	+	+	
III (C <sub>18:0</sub> )		+				
III (C <sub>18:1</sub> , NMe)		+	+			
IV (C <sub>14:0</sub> )	+	+	+		+	+
IV (C <sub>14:0</sub> , NMe)		+	+		+	
IV (C <sub>16:1</sub> )	+	+	+		+	+
IV (C <sub>16:0</sub> )	+	+	+	+	+	+
IV (C <sub>16:1</sub> , NMe)		+	+		+	
IV (C <sub>16:0</sub> , NMe)		+	+		+	
IV(C <sub>18:1</sub> )	+	+	+	+	+	+
IV(C <sub>18:0</sub> )	+	+	+	+	+	
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+	+		+	+
IV (C <sub>18:0</sub> , NMe)			+		+	
IV (C <sub>18:1</sub> , S)	+					
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)			+		+	+
IV (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)			+			
V(C <sub>16:1</sub> ,NMe, dNAc)			+			
V(C <sub>16:0</sub> ,NMe, dNAc)			+			
IV (C <sub>18:0</sub> -OH)		+				

## Apéndice

Tabla V.- Continuación

Estructura	CIAT899			C8		
	B <sup>-</sup>	Apigenina	NaCl 300 mM	B <sup>-</sup>	Apigenina	NaCl 300 mM
V (C <sub>14:0</sub> )		+				
V (C <sub>14:0</sub> , NMe)		+	+		+	
V(C <sub>18:1</sub> ,NMe, dNAc)		+	+			
V (C <sub>16:0</sub> )		+	+	+		+
V (C <sub>16:1</sub> )				+		+
V (C <sub>16:1</sub> , S)				+		
V (C <sub>16:1</sub> , NMe)		+	+		+	+
V (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+	+	+		+	+
V (C <sub>18:1</sub> )	+					+
V (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+	+	+		+	+
V (C <sub>18:0</sub> , NMe)		+	+		+	+
V (C <sub>18:0</sub> -OH)		+				
V (C <sub>16:0</sub> , NMe, S)		+	+		+	+
V (C <sub>18:1</sub> , S)	+	+	+			+
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)	+	+	+	+	+	+
V (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)		+	+		+	+
V(C <sub>20:1</sub> ,NMe,S)			+			

Tabla VI.- Tabla comparativa de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 y el mutante C9 en medio mínimo B<sup>-</sup> en condiciones control (B<sup>-</sup>), con apigenina (Api), con NaCl 300 mM y con apigenina y NaCl 300 mM.

Fuente: <sup>(a)</sup> Esta Tesis. <sup>(b)</sup> Estévez *et al.*, 2009. <sup>(c)</sup> Estévez, J. Tesis Doctoral, 2007. <sup>(d)</sup> Datos cedidos por el Profesor Manuel Megías.

Estructura	CIAT899				C9			
	B <sup>-</sup> <sup>(d)</sup>	Api <sup>(b)</sup>	NaCl 300 mM <sup>(c)</sup>	Api y NaCl 300 mM <sup>(b)</sup>	B <sup>-</sup> <sup>(a)</sup>	Api <sup>(a)</sup>	NaCl 300 mM <sup>(a)</sup>	Api y NaCl 300 mM <sup>(a)</sup>
II-Hex (C <sub>18:1</sub> )			+					
III (C <sub>16:0</sub> )			+					
III (C <sub>16:0</sub> , NMe)	+		+					
III (C <sub>18:1</sub> )	+		+					
III (C <sub>18:1</sub> , NMe)	+		+					
III (C <sub>18:1</sub> , dNAc)	+							

Tabla VI.- Continuación

Estructura	CIAT899				C9			
	B <sup>-</sup> (d)	Api (b)	NaCl 300 mM (c)	Api y NaCl 300 mM (b)	B <sup>-</sup> (a)	Api (a)	NaCl 300 mM (a)	Api y NaCl 300 mM (a)
III (C <sub>18:0</sub> -OH)			+					
III (C <sub>18:0</sub> -OH, NMe)			+					
III (C <sub>22:3</sub> , NMe)			+					
III-Hex (C <sub>18:1</sub> )			+					
III-Hex (C <sub>18:1</sub> , NMe)			+					
III-Hex (C <sub>18:0</sub> -OH, NMe)			+					
IV (C <sub>14:0</sub> )			+	+				
IV (C <sub>14:0</sub> , NMe)			+	+				
IV (C <sub>16:1</sub> )			+					
IV (C <sub>16:0</sub> )		+	+	+		+		
IV (C <sub>16:1</sub> , NMe)			+					
IV (C <sub>16:0</sub> , NMe)		+	+	+				
IV (C <sub>18:1</sub> )	+	+	+	+		+		
IV (C <sub>18:0</sub> )	+		+	+				
IV(C <sub>16:0</sub> -OH, NMe)			+					
IV(C <sub>18:2</sub> , NMe)			+					
IV(C <sub>18:1</sub> , NMe)		+	+	+		+		
IV(C <sub>18:0</sub> , NMe)			+	+				
IV(C <sub>18:0</sub> -OH, NMe)			+					
IV(C <sub>18:0</sub> -OH)				+				
IV(C <sub>20:0</sub> -OH)				+				
V(C <sub>20:0</sub> -OH, NMe)				+				
IV(C <sub>18:0</sub> -OH, NMe, Ac)		+						
IV-Man (C <sub>12:0</sub> , NMe)		+						
IV-Man (C <sub>10:0</sub> -OH, Cb)		+						
IV (C <sub>20:0</sub> , NMe)			+					
IV (C <sub>22:3</sub> , NMe)			+					
IV (C <sub>18:1</sub> , S)			+					
IV (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)			+	+				
IV (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)		+	+	+				
IV (C <sub>20:1</sub> , S)		+						
IV-Hex (C <sub>14:0</sub> )			+					

## Apéndice

Tabla VI.- Continuación

Estructura	CIAT899				C9			
	B <sup>-</sup> (d)	Api (b)	NaCl 300 mM (c)	Api y NaCl 300 mM (b)	B <sup>-</sup> (a)	Api (a)	NaCl 300 mM (a)	Api y NaCl 300 mM (a)
IV (C <sub>20:0</sub> , NMe, S)			+					
IV (C <sub>20:0</sub> )			+					
IV (C <sub>20:1</sub> , NMe, S)			+					
V (C <sub>12:0</sub> , NMe)		+		+				
V(C <sub>14:0</sub> )		+	+	+				
V (C <sub>10:0-OH</sub> , Cb)		+						
IV (C <sub>18:1</sub> , Fuc)				+				
IV (C <sub>18:1</sub> , MeFuc)				+				
IV (C <sub>20:0-OH</sub> , NMe, S)				+				
IV-Man (C <sub>18:1</sub> )				+				
V (C <sub>14:1</sub> , NMe)			+					
V (C <sub>14:0</sub> , NMe)		+	+	+				
IV (C <sub>10:0-OH</sub> , NMe, Cb)		+						
IV-Man (C <sub>18:1</sub> , NMe)		+						
V (C <sub>16:0</sub> )			+	+				+
V (C <sub>16:1</sub> )			+					
V (C <sub>16:1</sub> , NMe)			+	+				
V (C <sub>16:0</sub> , NMe, dNAc)						+		+
IV-Hex (C <sub>18:1</sub> , NMe)			+					
V (C <sub>16:0</sub> , NMe )		+	+	+		+		+
V(C <sub>18:1</sub> )	+		+	+		+		+
V(C <sub>18:0</sub> ) / V(C <sub>16:1-OH</sub> , NMe)			+	+				
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, dNAc )						+		+
V (C <sub>18:2</sub> , NMe )			+					
V (C <sub>18:1</sub> , NMe )	+	+	+	+		+		+
V (C <sub>18:1</sub> , dNAc)	+							
V (C <sub>18:0</sub> , NMe)		+	+	+				
V(C <sub>18:0-OH</sub> )			+	+				
IV-Hex (C <sub>22:3</sub> , NMe)			+					
V(C <sub>20:1</sub> )		+	+					
V(C <sub>20:0</sub> )		+	+	+				
V(C <sub>18:0-OH</sub> , NMe)				+				

Tabla VI.- Continuación

Estructura	CIAT899				C9			
	B <sup>-</sup> (d)	Api (b)	NaCl 300 mM (c)	Api y NaCl 300 mM (b)	B <sup>-</sup> (a)	Api (a)	NaCl 300 mM (a)	Api y NaCl 300 mM (a)
V(C <sub>20:0</sub> , NMe)		+	+					
V(C <sub>20:0</sub> -OH)				+				
V(C <sub>22:1</sub> ) / V(C <sub>18:1</sub> -OH, NMe, Ac)		+						
V(C <sub>20:1</sub> -OH, NMe)		+						
V(C <sub>20:0</sub> -OH, NMe)				+				
V (C <sub>16:0</sub> , S)			+	+				
V(C <sub>20:0</sub> -OH, Ac) / V(C <sub>22:0</sub> -OH, NMe)		+						
V (C <sub>16:1</sub> , NMe, S)		+						
V (C <sub>22:3</sub> , NMe)			+					
V (C <sub>16:0</sub> , NMe, S)			+	+				
V (C <sub>18:1</sub> , S)			+					
V (C <sub>18:0</sub> , S)				+				
V (C <sub>22:0</sub> -OH, NMe)			+					
V (C <sub>18:1</sub> , NMe, S)		+	+	+		+		+
V (C <sub>18:0</sub> , NMe, S)		+	+	+				
V (C <sub>20:1</sub> , S)		+		+				
V (C <sub>20:0</sub> , S)		+	+	+				
V(C <sub>18:0</sub> -OH, NMe, S)				+				
V (C <sub>20:1</sub> , NMe, S)			+	+				
V (C <sub>20:0</sub> , NMe, S)			+	+				
V(C <sub>22:1</sub> , S) / V(C <sub>18:1</sub> , NMe, Ac, S)				+				
V (C <sub>18:1</sub> , MeFuc)				+				
V (C <sub>20:0</sub> -OH, NMe, S)				+				
V (C <sub>16:1</sub> , NMe, S, S)				+				







SEVILLA, 2011

