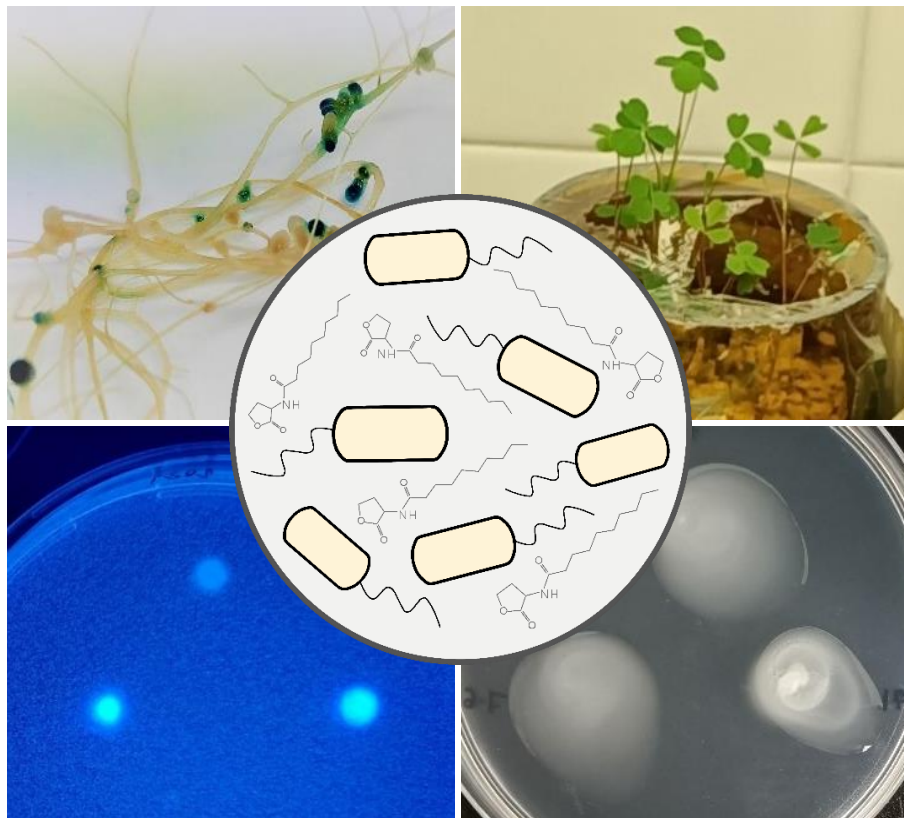




Facultad de Biología
Departamento de Microbiología
Grado en Biología



Implicación de las *N*-acil homoserina lactonas en el fenotipo y las propiedades simbióticas de *Ensifer meliloti* SVQ747 y su mutante en el sistema RND NoIG



Trabajo de Fin de Grado

Marina Murillo Torres

Tutora: María del Rosario Espuny Gómez

Codirectora: Cynthia Victoria Alías Villegas

Sevilla, junio de 2020

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	1
Objetivos	6
Materiales y métodos	7
Bacterias, medios y condiciones de cultivo	7
Obtención de estirpes portadoras de los plásmidos pME6000 y pME6863	9
Métodos utilizados en el estudio de las bacterias	10
Ensayo de difusión en placa para determinar la producción de AHL	10
Movilidad, morfología de las colonias y producción de EPS	11
Métodos utilizados para los estudios con alfalfa (<i>Medicago sativa</i> cv. Aragón)	11
Desinfección y germinación de semillas	11
Ensayo de efectividad de simbiosis con la alfalfa	12
Ensayo de competitividad por la nodulación de la alfalfa	12
Resultados y discusión	14
Obtención de estirpes de <i>E. meliloti</i> SVQ747 y SVQ749 no productoras de AHL.....	14
Ensayos en placa para el estudio de la movilidad, las características morfológicas de las colonias y la producción de EPS	16
Estudio de las propiedades simbióticas de las estirpes no productoras de AHL frente a las parentales	20
Ensayo de eficiencia de nodulación.....	21
Ensayos de competitividad por la nodulación de la alfalfa	23
Conclusiones	26
Bibliografía	27

RESUMEN

Los sistemas RND (*Resistance-Nodulation-Cell-Division*) son una familia de transportadores bacterianos que permiten la expulsión de sustancias antimicrobianas y, en algunos casos, de metabolitos endógenos como las AHL (*N*-acil homoserina lactonas), moléculas que actúan como autoinductores en el mecanismo de *quorum sensing*. Es común encontrar este sistema de comunicación en los rizobios, bacterias Gram-negativas del suelo que fijan nitrógeno atmosférico en simbiosis con raíces de plantas leguminosas. En este trabajo, se indagará sobre efectos fenotípicos que producen las AHL sobre *Ensifer meliloti* SVQ747, un rizobio aislado de las marismas del Odiel, y *E. meliloti* SVQ749, su mutante en el sistema RND NolG. Los resultados obtenidos apuntan a que las AHL parecen afectar a la movilidad de tipo *swimming* y a la producción de EPS. Sin embargo, no tienen un papel relevante en la efectividad de la simbiosis con la alfalfa (*Medicago sativa*), aunque sí parecen influir en la capacidad competitiva por la nodulación. Además, la mayor capacidad competitiva que presenta *E. meliloti* SVQ749 podría deberse a cambios en la producción o exportación de AHL que habría que continuar estudiando.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias utilizan diferentes mecanismos para resistir a las sustancias antimicrobianas a las que están expuestas. El mecanismo más común consiste en el empleo de bombas dependientes de gasto energético que expulsan activamente estas sustancias al exterior, lo que disminuye su concentración activa en el interior de la célula y dificulta su acceso a la molécula diana. Algunas de estas bombas confieren resistencia a más de una sustancia diferente, fenómeno denominado “resistencia cruzada”. Entre ellas encontramos los transportadores del sistema MDR (*Multidrug Resistance flux pumps*) (Blanco *et al.*, 2016), entre los cuales se han descrito cinco familias diferentes. Una de ellas es la familia RND (*Resistance-Nodulation-cell Division*), que utiliza la fuerza protón motriz para dirigir la translocación de sustancias al exterior. Su estructura consiste en un complejo de tres proteínas: una de membrana interna (proteína RND), una de fusión en el espacio periplásmico (MFP) y una de membrana externa (OMP) (Eda *et al.*, 2011; Fernando y Kumar, 2013). En *Escherichia coli*, donde la estructura se conoce muy bien, estos componentes se denominan AcrB, AcrA y TolC, respectivamente (**Figura 1**). Los tres forman un canal continuo a través del periplasma que permite translocar un sustrato desde la membrana interna al exterior (Blair y Piddock, 2009).

Los sistemas RND no sólo permiten devolver al medio compuestos tóxicos procedentes del exterior, sino que, en algunos casos, también parecen expulsar metabolitos endógenos, algunos de ellos mediadores del mecanismo de *quorum sensing* (QS) (Fernando y Kumar, 2013). El QS es un proceso de comunicación intercelular en el que las bacterias producen y detectan a la vez moléculas señal llamadas autoinductores (AI) que modifican la expresión génica, lo que les permite generar respuestas coordinadas entre las células de la población. Estas moléculas son sintetizadas constitutivamente a muy baja concentración, por lo que se requiere de una alta densidad celular para alcanzar una concentración molecular crítica que afecte a la mayoría de la población (Fuqua y Greenberg, 2002). Las señales más utilizadas por bacterias Gram-negativas son de tipo *N*-acil homoserina lactona (AHL), formadas por un anillo de homoserina lactona y una cadena acílica de longitud variable con distintas modificaciones (Figura 2) (Kan *et al.*, 2017; Blanco *et al.*, 2016).

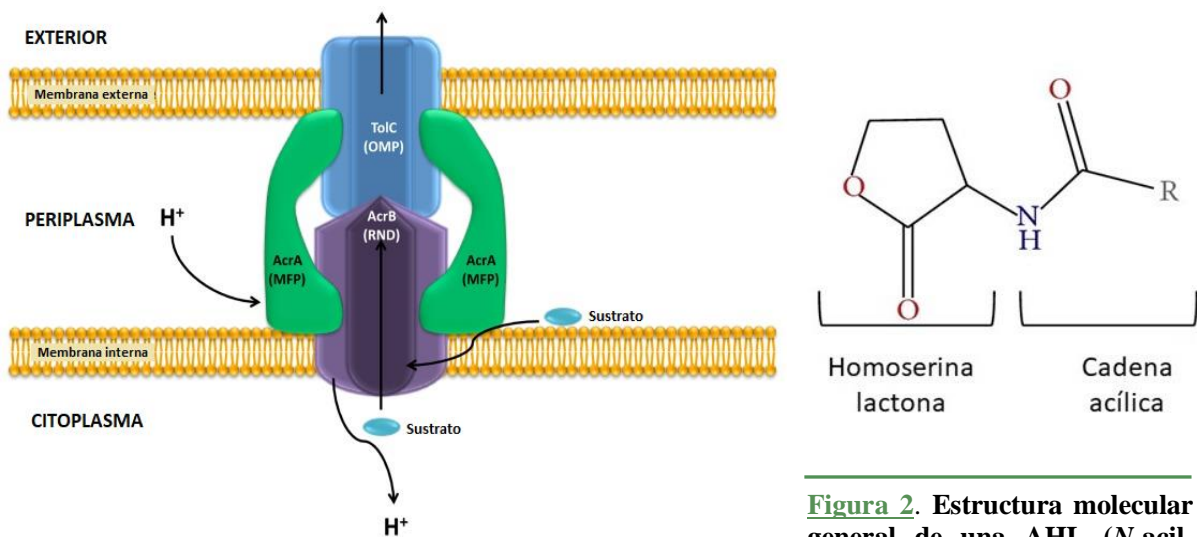


Figura 1. Estructura de los transportadores RND en *E. coli*. Figura modificada de Álvarez-Ortega *et al.* (2013)

Figura 2. Estructura molecular general de una AHL (*N*-acil-homoserina lactona) típica. Figura modificada de Chan *et al.* (2014).

El mecanismo de QS es muy común en bacterias Gram-negativas asociadas a plantas y regula muchos procesos fisiológicos implicados en la interacción planta-microorganismo. Es el caso de los rizobios, bacterias Gram-negativas del suelo que, en simbiosis con plantas leguminosas, son capaces de fijar nitrógeno molecular y reducirlo hasta amonio, que puede ser incorporado por la planta. El rasgo principal de esta simbiosis es la formación de nódulos en las raíces de la planta, estructuras que proporcionan un ambiente anaerobio idóneo para la actividad fijadora de la nitrogenasa (Oldroyd *et al.*,

2011). El proceso simbiótico comienza cuando los rizobios reconocen moléculas señal liberadas por la raíz llamadas flavonoides que activan en la bacteria a la proteína NodD, reguladora transcripcional de los genes *nod*. Los productos codificados por estos genes participan en la síntesis de moléculas específicas de cada estirpe denominadas factores Nod o LCO, implicados en procesos como la curvatura del pelo radical y la formación del meristemo nodular en el interior de la raíz, ambos fenómenos necesarios para la nodulación. Los nódulos resultantes pueden ser determinados o indeterminados, siendo los primeros nódulos globulares sin meristemo persistente, y los segundos nódulos cilíndricos con meristemo persistente (Saeki, 2011). Un esquema del proceso de nodulación e imágenes de los dos tipos de nódulo aparecen representados en la **Figura 3**.

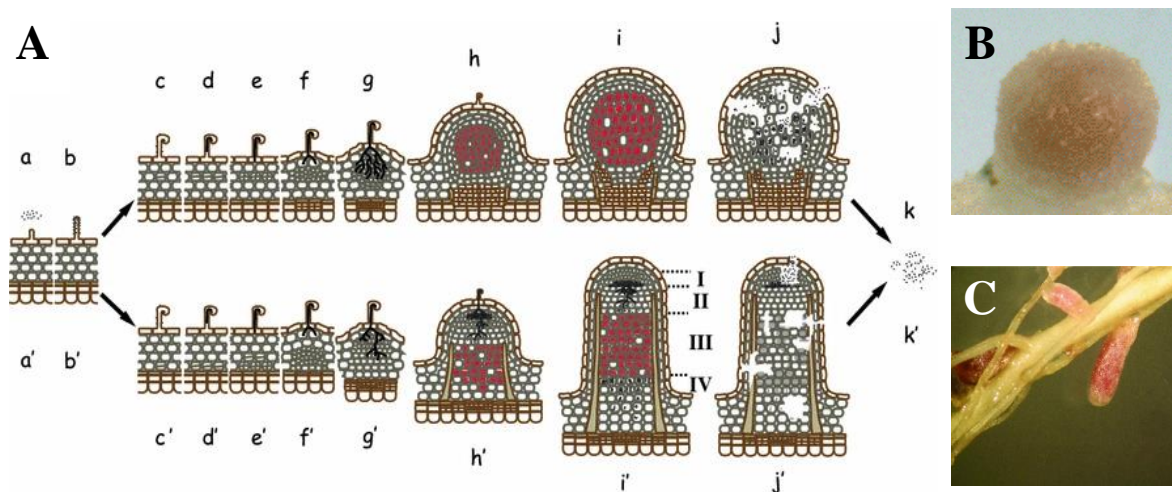


Figura 3. A. Formación de nódulos determinados (arriba) y nódulos indeterminados (abajo). (a) Los rizobios se unen a los extremos de los pelos radicales, (b) detectan flavonoides específicos de las leguminosas y secretan factores Nod para inducir la curvatura de la raíz. (c) La raíz adopta la forma de cayado de pastor y atrapa a los rizobios. La pared celular de la célula radical se invagina y comienza a formar un conducto, el tubo de infección. (d) El tubo de infección crece hacia el interior del córtex (e) y se va ramificando. (f,g) Las bacterias llegan a las células del meristemo nodular y entran en ellas en un proceso parecido a la endocitosis, quedando envueltas por membrana de la célula vegetal. En ese momento son liberados al citosol de la célula vegetal. (h) En este estado empiezan a alargarse, diferenciándose así a bacteroides. En un momento determinado comienzan la fijación de nitrógeno, pasando a llamarse simbiosomas. (i) Tras un período de fijación, las células nodulares entran en senescencia. (j,k) La mayoría de los bacteroides de los nódulos determinados, junto con las bacterias que aún permanecen en el tubo de infección, vuelven al suelo. No ocurrirá en tan elevada proporción en el caso de los nódulos indeterminados. Los puntos rotulados en números romanos representan diferentes zonas en el nódulo: I – Meristemo nodular, II – Zona de invasión, III – Zona de fijación del N₂, IV – Zona de senescencia (Saeki, 2011). **B. Nódulo determinado típico de la simbiosis entre *Lotus japonicus* y *Mesorhizobium loti*** (Okazaki *et al.*, 2007). **C. Nódulo indeterminado típico de la simbiosis entre *E. meliloti* y *Medicago sativa*** (Rivas *et al.*, 2009).

En rizobios, el QS permite regular ciertos comportamientos como la transferencia de plásmidos e islas simbióticas, la producción de exopolisacáridos (EPS), la movilidad bacteriana, la formación de *biofilms*, la nodulación o la fijación del nitrógeno. Estos fenotipos pueden ser relevantes en la simbiosis ya que, en algunos casos, su expresión coordinada facilita la transición desde la forma de vida libre del rizobio a la forma simbiote. En *E. meliloti* Rm1021, se ha estudiado cómo las AHL actúan sobre estos fenotipos. Esta estirpe presenta tres genes cromosómicos clave: *sinI*, *sinR* y *expR* (Figura 4). *sinI* codifica una AHL-sintasa que sintetiza AHL a partir de S-adenosil-L-metionina (SAM) y de acil-ACP. Aguas arriba se encuentra *sinR*, que codifica un regulador transcripcional independiente de AHL que controla positivamente la expresión de *sinI*. En otra región cromosómica se encuentra *expR*, que codifica otro regulador que actúa, entre otros genes, sobre *sinI*. La actuación de ExpR sobre *sinI* varía según la concentración de AHL: a concentraciones moderadas, aumenta su expresión, generando el bucle de retroalimentación positiva propio del fenómeno de QS, mientras que, a altas concentraciones, silencia la expresión de *sinR*, lo que lleva a una retroalimentación negativa de *sinI* (Calatrava-Morales *et al.*, 2018). Además, hay otros factores influyentes como, por ejemplo, la limitación de fosfato (McIntosh *et al.*, 2009), carbono o nitrógeno (Krol y Becker, 2011), que favorecen la expresión de *sinI*.

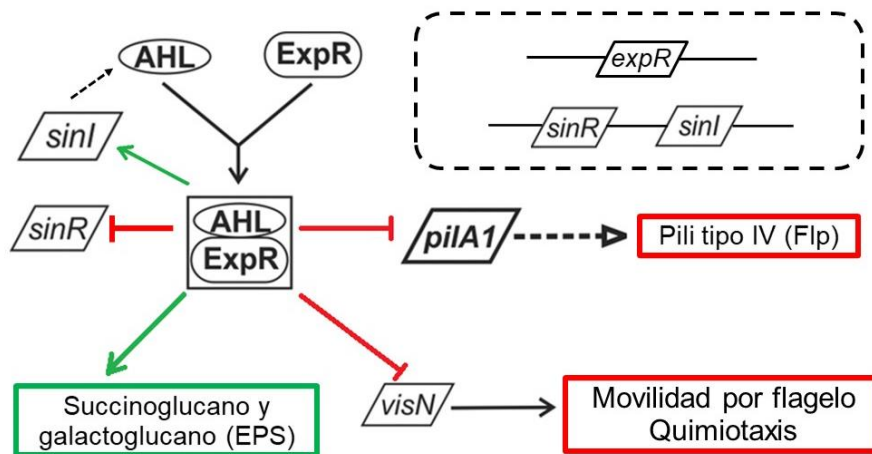


Figura 4. Esquema de los cambios transcripcionales que ocurren en *E. meliloti* Rm1021 durante el mecanismo de QS. En el recuadro, se representa la disposición de los genes *sinI*, *sinR* y *expR* en el cromosoma bacteriano. A concentraciones moderadas de AHL, éstas forman un complejo con ExpR que activa la expresión de *sinI*, lo que se traduce en un aumento de los niveles de AHL. A concentraciones altas, el complejo ExpR-AHL inhibe la expresión de *sinR*. Por otro lado, la formación de este complejo es necesaria para regular la expresión de genes de ciertos procesos dependientes de QS como la síntesis de EPS, de flagelo, o de pili tipo IVb. En verde, se representan los procesos favorecidos en presencia de AHL, y en rojo, los procesos reprimidos. Figura modificada de Zatakia *et al.* (2014).

Cabe destacar que ExpR es un activador tan versátil que puede actuar sobre algunos genes en ausencia de AHL, aunque la formación de un complejo ExpR-AHL es necesaria para regular la expresión de ciertos genes, como los implicados en la síntesis de EPS o la represión de formación de flagelo (Charoenpanich *et al.*, 2013; Gurich y González, 2009). Los EPS son polímeros extracelulares que permanecen débilmente asociados a la superficie de la bacteria. En *E. meliloti* se han descrito dos tipos: succinoglucano, o EPSI, y galactoglucano, o EPSII. Se han propuesto muchas funciones para estas moléculas en la simbiosis, tales como la protección ante factores ambientales, la determinación de la especificidad por el hospedador, la adhesión a la raíz, la formación del tubo de infección o la actuación como molécula señal (Rinaudi y González, 2009).

Algunas de las proteínas implicadas en la síntesis de EPS, concretamente MucR, ExoR y ExpR, parecen estar también implicadas en la movilidad (Janczarek, 2011). Las bacterias emplean estrategias muy diversas para desplazarse, entre las que se distinguen movimientos en medio líquido (*swimming*) y movimientos sobre superficies. El *swimming* es un movimiento individual y dependiente de flagelo que se da en medios líquidos o de baja viscosidad. El *swarming* también depende de flagelo, pero se diferencia en ser un desplazamiento rápido y coordinado de todo el conjunto de células sobre una superficie. El *sliding* es un movimiento pasivo generado por las fuerzas expansivas de la colonia al crecer sobre la superficie. El *twitching*, también en superficie, es dependiente de pili de tipo IV, y el *gliding* tiene lugar a lo largo del eje longitudinal de la célula mediante complejos focales de adhesión (Kearns, 2010). En *E. meliloti* se han descrito movi­lidades tipo *swimming*, *swarming* y *sliding* (Mattingly *et al.*, 2018). *Swarming* y *sliding* están favorecidos por la producción de surfactantes como los EPS que reducen la fricción de las células con el medio y consigo mismas, facilitando así el deslizamiento. La producción de grandes cantidades de EPSII también está relacionada con un nuevo tipo de movimiento llamado *surfing* (Dilanji *et al.*, 2014).

E. meliloti Rm1021 presenta 17 sistemas MDR diferentes, 10 de los cuales pertenecen al sistema RND. Uno de ellos es NolG, codificado desde el operón *nodM-nolFG-nodN*, que queda aguas abajo de un promotor inducible por flavonoides (*nodbox*). NolF es la MFP que conecta el transportador con una proteína OMF, codificada por un gen ajeno al operón, mientras que NodM presenta homología con una glucosamina sintetasa, y NodN con una deshidratasa de ácidos grasos. Ni la función de la bomba NolG durante la simbiosis ni los sustratos que transporta se conocen bien, si bien se ha llegado

a postular sobre su posible implicación en la exportación de factores Nod (Baev *et al.*, 1991; Eda *et al.*, 2011).

El organismo objeto de este trabajo es *E. meliloti* SVQ747. Se trata de un mutante espontáneo a rifampicina obtenido a partir de ORT12, un rizobio tolerante a metales pesados aislado de nódulos de *Medicago marina* en suelos arenosos de las marismas del Odiel (Huelva). Este paraje se ha visto sometido a la influencia de fenómenos naturales e industriales que han acumulado una gran cantidad de metales pesados y otros contaminantes en el suelo. En estudios anteriores, se ha demostrado que el operón *nodMnolFGnodN* de *E. meliloti* SVQ747 presenta una expresión muy baja en presencia de luteolina. Así mismo, *nolG* parece no estar implicado en la resistencia a metales pesados ni a otras sustancias antimicrobianas, y la delección de los genes *nodM*, *nodN* o *nolG* no produce diferencias en la producción de factores Nod ni en la simbiosis con la alfalfa. Sin embargo, el mutante SVQ749, generado por inserción en el gen *nolG*, presenta una mejor capacidad competitiva por la nodulación de la alfalfa frente a la estirpe silvestre, sin afectar la eficacia de fijación de nitrógeno. Eso implicaría que las sustancias transportadas a través de *NolG* no son esenciales para la simbiosis, pero que contribuirían a la competitividad por la nodulación (Alías-Villegas *et al.*, 2015; Alías-Villegas, 2016). Además, se conoce que SVQ747 es productora de AHL: presenta genes *sinI*, *sinR* y, a diferencia de Sm1021 y Sm2011, un gen *expR* no interrumpido, lo que permite la síntesis de EPSII en condiciones normales y explicaría la alta mucosidad de esta bacteria (M.R. Espuny, comunicación personal). Teniendo esto en cuenta, en este trabajo se tratará de averiguar si las AHL juegan un papel importante en la simbiosis de *E. meliloti* SVQ747 y *E. meliloti* SVQ749 con *Medicago sativa* y si existe alguna relación entre la mayor competitividad del mutante en *nolG*, SVQ749, y la producción y/o exportación de AHL.

OBJETIVOS

1. Obtener estirpes incapaces de producir AHL introduciendo mediante conjugación bacteriana el gen *aiiA* de *Bacillus*, que codifica una lactonasa de AHL.
2. Estudiar la movilidad, la morfología de la colonia y las características del EPS de SVQ747 y SVQ749, así como la de sus derivados carentes de AHL.
3. Estudiar la capacidad competitiva y la efectividad de la simbiosis de las estirpes carentes de AHL frente a la estirpe silvestre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se muestran en la **Tabla 1** las estirpes bacterianas y plásmidos empleados, y en los **Tablas 2 y 3**, los medios de cultivo elaborados para la realización de los ensayos.

Tabla 1. Estirpes bacterianas y plásmidos empleados en este trabajo

BACTERIAS		
Estirpe	Características	Referencia
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
NT1 (pZRL4)	<i>A. tumefaciens</i> curada del plásmido pTiC58; <i>traG::lacZ</i> , <i>traR</i> . Gm ³⁰	Cha <i>et al.</i> , 1998
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>SupE44</i> , <i>ΔlacU169</i> , <i>5hsdR17</i> , <i>recAI</i> , <i>endAI</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-I</i> , <i>relAI</i> , <i>NxR</i> . Km ²⁵	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
S17-1	<i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>recA</i> , <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , RP4-2-2Tc::Mu, <i>Km::Tn7</i> Tmp ^R , Str ^R , Spt ^R	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>Ensifer meliloti</i>		
SVQ747	ORT12, Rif ⁵⁰	Alías-Villegas, 2016
SVQ749	SVQ747 mutado en el gen <i>nolG</i> por inserción del casete <i>lacZ</i> -Gm en el mismo sentido del gen. Rif ⁵⁰ Gm ²⁵	Alías-Villegas, 2016
SVQ747 (pGUS3)	SVQ747 que porta el plásmido pGUS3. Rif ⁵⁰ , Km ²⁰⁰	Alías-Villegas, 2016
SVQ747 (pME6863)	SVQ747 que porta el plásmido pME6863. Rif ⁵⁰ , Tc ³⁰	Cedida por M. R. Espuny (sin publicar)
SVQ749 (pME6863)	SVQ749 que porta el plásmido pME6863. Rif ⁵⁰ , Tc ⁴⁰	Este trabajo
SVQ747 (pME6000)	SVQ747 que porta el plásmido pME6000. Rif ⁵⁰ , Tc ⁴⁰	Este trabajo
SVQ749 (pME6000)	SVQ749 que porta el plásmido pME6000. Rif ⁵⁰ , Tc ⁴⁰	Este trabajo
PLÁSMIDOS		
Plásmido	Características relevantes	Referencia
pME6000	Vector de clonación de amplio rango. Tc ³⁰	Lefebre y Valvano, 2002
pME6863	pME6000 con el gen <i>aiiA</i> bajo el control del promotor del gen <i>lacZ</i>	Reimann <i>et al.</i> , 2002
pRK2013	Plásmido coadyuvante con los genes <i>mob</i> y <i>tra</i> , Km ³⁰	Figurski y Helinski, 1979

Gm²⁵, resistente a 25 μ g/ml de gentamicina; Km²⁰⁰, resistente a 200 μ g/ml de kanamicina; Rif⁵⁰, resistente a 50 μ g/ml de rifampicina; Tc³⁰, resistente a 30 μ g/ml de tetraciclina.

Tabla 2. Medios de cultivo de bacterias

Medio Bromfield (Sourjik <i>et al.</i> , 1996)	
Extracto de levadura	0,4 g
Triptona	0,1 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,1 g
Agar bacteriológico	3 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

Medio LB (Sambrook *et al.*, 1989)

Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
NaCl	5 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

Medio Mínimo o MM (Robertsen *et al.*, 1981)

K ₂ HPO ₄	0,3 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,15 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,05 g
FeCl ₃	0,006 g
NaCl	0,05 g
Glutamato sódico	1,1 g
Manitol	10 g
Solución de vitaminas (1000x)	1 mL
H ₂ O destilada	Completar hasta 1L

Solución de vitaminas

Biotina	0,02 g
Tiamina	0,01 g
Pantotenato sódico	0,01 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

* Se esterilizó por filtración y se adición 1 mL por litro de MM autoclavado.

Medio YM (Vincent, 1970)

K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,2 g
Extracto de levadura	0,1 g
Manitol	10/3 g*
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

* 10 g para una solución YM10 y 3g para una solución YM3.

Medio TY (Behringer, 1974)

Extracto de levadura	3 g
Triptona	5 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,65 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

Tras la elaboración de todos los medios, se ajustó el pH a 6,8-7,0 y se realizó una esterilización en autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de presión (121°C).

Tabla 3. Soluciones nutritivas para plantas**Rigaud & Puppo (Rigaud y Puppo, 1975) R&P**

K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
KCl	0,2 g
CaSO ₄ · 2H ₂ O	0,12 g
Solución de microelementos Gibson	1 ml
Quelato de hierro (6%)	0,0025 g
Agua destilada	Completar hasta 1 L

Solución de microelementos Gibson 100X

H ₃ BO ₃	2,86 g
MnSO ₄ · H ₂ O	2,08 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,22 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,08 g
Na ₂ MoO ₄	0,11 g
Agua destilada	Completar hasta 1 L

Obtención de estirpes portadoras de los plásmidos pME6000 y pME6863

Para la transferencia de plásmidos desde las distintas estirpes de *E. coli* a *E. meliloti*, se realizaron conjugaciones bacterianas mezclando, en un tubo eppendorf, 200 µL de la estirpe de *E. coli* donadora, crecida en medio LB con los antibióticos adecuados durante 18 horas, y 100 µl de la estirpe de rizobio receptora, crecida en medio TY con los antibióticos adecuados durante 2 días. Cuando fue necesario se añadieron 100 µl de la estirpe de *E. coli* portadora del plásmido coadyuvante pRK2013. Tras centrifugar cada mezcla durante 5 minutos a 5000 rpm, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 800 µl de agua destilada estéril. Tras una nueva centrifugación, se retiró de nuevo el sobrenadante, se volvió a resuspender el *pellet* en 100 µl de agua destilada estéril y se depositó en forma de gota en una placa de TY sin antibiótico que fue incubada durante 24 horas a 28°C. Pasado este período, se recogió la biomasa obtenida, se resuspendió en 1 ml de glicerol (20%)-peptona (0,5%), y se congeló a -20°C hasta su uso. Posteriormente, se seleccionaron las colonias transconjugantes en placas de TY con antibióticos adecuados, y finalmente se purificaron por sucesivas resiembras en el mismo medio selectivo.

Para confirmar que los plásmidos habían sido introducidos en las estirpes aceptoras correctamente, se realizó una extracción del ADN plasmídico de los candidatos seleccionados siguiendo el método manual de mini preparación mediante lisis alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989). Se comprobó que el producto obtenido contenía ADN plasmídico cargándolo en un gel de agarosa al 0,8%, en tampón TAE 0,5X (Tris-HCl 30mM, 0,002% EDTA 0,5M pH 8, ácido acético glacial 0,00114%, ajustado a pH 8). Tras esto, realizó una amplificación por PCR utilizando los cebadores universales de los fagos T3 (5'-GCAATTAACCCTCACTAAAGG-3') y T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'), los cuales flanquean el sitio de clonaje del gen *aiiA* en el vector. Se realizó según el protocolo descrito por Saiki en 1990. Por cada muestra, se prepararon 20 µl de muestra de reacción con 1 µl de muestra (diluido 1/25),

dNTPs (0,2 mM), tampón de PCR (1X), los cebadores antes mencionados (0,2 μ M cada uno), y 0,1 U de Taq polimerasa (New England Biolabs, EEUU). El programa utilizado para la amplificación en cada caso siguió el siguiente esquema común:

1. Desnaturalización del ADN a 95°C durante 5 minutos.
2. Desnaturalización del ADN a 95°C durante 30 segundos.
3. Unión de los cebadores al ADN de cadena simple a la temperatura recomendada por el fabricante durante 30 segundos.
4. Polimerización del ADN a 72°C variando el tiempo de polimerización en función del tamaño del ADN a amplificar y la polimerasa empleada.
5. Repetición del ciclo de polimerización (desde el paso 2), 35 veces más.
6. Polimerización del ADN a 72°C durante 2-5 minutos.

Finalmente, los productos obtenidos fueron cargados en un gel de agarosa (al 0,8%, en tampón TAE 0,5%) para observar el tamaño de la banda amplificada por la polimerasa.

Métodos utilizados en el estudio de las bacterias

Ensayo de difusión en placa para determinar la producción de AHL

Para la realización de este ensayo, se extrajeron sobrenadantes de cultivos líquidos de los rizobios crecidos durante tres días a 28°C en medio YM3 sin antibiótico. La extracción se realizó mediante dos centrifugaciones sucesivas a 13000 rpm. Paralelamente, se prepararon placas de Petri con medio YMA con perforaciones de 0,8 de diámetro y 1 cm de altura. Para ello, se utilizaron placas vacías donde se colocaron cilindros metálicos huecos de estas dimensiones previamente esterilizados. Estos cilindros permiten preservar un hueco vacío una vez se vierte el medio de cultivo. A continuación, se utilizaron 4 ml de medio YM al 0,8% de agar, fundido y mezclado con 60 μ L de X-gal y 400 μ L de cultivo líquido de tres días del biosensor *Agrobacterium tumefaciens* NT1 (pZLR4). La mezcla fue vertida directamente sobre la placa. Tras su solidificación, los cilindros metálicos fueron retirados con una pinza esterilizada, quedando pocillos vacíos a los que se añadieron 200 ó 100 μ L de los sobrenadantes bacterianos previamente extraídos. Finalmente, se incubó la placa durante 24-48 horas a 28°C y se fotografió el halo azul desarrollado.

Movilidad, morfología de las colonias y producción de EPS

Para estudiar estas características, se obtuvieron primero cultivos frescos de las bacterias en medio TY líquido a 28°C con una $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,9-1.

Para analizar la movilidad tipo *swimming*, se prepararon placas de Petri con 25 mL de medio Bromfield al 0,3% de agar y se dejaron solidificar tapadas en una superficie lo más horizontal posible. A continuación, se colocaron sobre ellas alícuotas de 3 μL de los cultivos introduciendo la punta de la pipeta hasta aproximadamente la mitad del grosor de la capa de medio. Tras esto, se taparon y se dejaron secar antes de incubarlas en una cámara húmeda a 28° C. A los 6, 8 y 10 días, se midió el diámetro del halo de dispersión de cada bacteria y se calculó la media de cada estirpe a partir de los resultados obtenidos de tres réplicas.

Para estudiar la morfología de las colonias y la producción de EPS, se prepararon placas de Petri con 25 mL de los medios MM y TY al 0,3% de agar, también dejando solidificar en una superficie lo más horizontal posible. En esta ocasión, se depositaron alícuotas de 3 μL de los cultivos sobre la superficie sin pinchar. Tras dejar secar todas las gotas, se taparon las placas y se incubaron boca abajo a 28°C durante una semana, período en el que se realizó un seguimiento tomando una foto cada 24 horas durante 3 días.

Para valorar si se producían cambios en las características del EPS producido por cada colonia, se analizó la capacidad de unir calcoflúor en placas de Petri con medio TY y MM al 0,3% de agar a las que se añadió calcoflúor (0,02 %). Tras incubar durante 6 días, se observaron las colonias bajo luz UV y se fotografió el resultado.

Métodos utilizados para los estudios con alfalfa (*Medicago sativa* cv. Aragón)

Desinfección y germinación de semillas

Las semillas se sumergieron en etanol de 96° durante 30 segundos, se lavaron con agua destilada estéril y se trataron con hipoclorito sódico al 6% durante 15 minutos. Seguidamente, se realizaron siete lavados con agua destilada estéril, dejando en el último lavado un reposo de 20 minutos en oscuridad durante 24 horas. Finalmente, las semillas fueron colocadas en una placa de Petri con agar agua (0,8 % de agar), incubadas durante 24-48 horas a 28°C hasta su germinación.

Ensayo de efectividad de simbiosis con la alfalfa

Para estudiar las propiedades simbióticas de cada estirpe, se prepararon 3 jarros Leonard por cada una de las estirpes *E. meliloti* a estudiar: SVQ747, SVQ749, SVQ747 (pME6863), SVQ749 (pME6863), SVQ747 (pME6000) y SVQ749 (pME6000). Estos jarros consisten en un depósito con aproximadamente 1,5 L de R&P sobre el que se coloca una maceta de 800 cm³ con una mezcla de vermiculita y perlita en proporción 2:1, también humedecida con 250 ml de R&P. Ambos compartimentos se mantienen conectados mediante una mecha de algodón de aproximadamente 20 cm de longitud. Para su utilización, los jarros fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos y 1 atmósfera de presión. Posteriormente, se colocó en cada uno de ellos unas 8 plántulas previamente desinfectadas y germinadas de *M. sativa*, y se inocularon con 400 µL por planta del cultivo bacteriano pertinente en medio YM líquido y sin antibiótico. Finalmente, y para preservar la esterilidad, cada jarro fue cubierto con un film transparente. Una vez así dispuestos, los jarros se introdujeron en la cámara de cultivo durante 8 semanas, en condiciones de intensidad lumínica de 500 µE/m²s¹, λ=400-700 nm, fotoperiodo 16/8 horas luz/oscuridad, temperatura de 24/18°C día/noche y humedad relativa de un 50%. Transcurrido este periodo, se separó la parte aérea de las raíces, se contó el número de nódulos desarrollados, y se secaron los nódulos y la parte aérea a 80°C durante 48 horas para, posteriormente, obtener los valores de peso seco de los mismos. Los datos obtenidos fueron analizados aplicando un ANOVA de un factor (p < 0,01).

Ensayo de competitividad por la nodulación de la alfalfa

Por cada pareja de bacterias a competir, se prepararon 14 tubos de cristal de 22 mm de diámetro, cada uno con una tira de papel de filtro y 10 mL de solución R&P, cerrados con tapón de algodón, y esterilizados en autoclave. Las combinaciones inoculadas en cada ensayo de competición se resumen en la **Tabla 4**. En cada tubo se colocó una plántula a media altura del papel de filtro. A continuación, se mantuvieron los tubos durante 48 horas en oscuridad a temperatura ambiente, y posteriormente se trasladaron a una cámara de cultivo para plantas, con las mismas condiciones que las del ensayo de eficiencia, donde permanecieron una semana, hasta el momento de su inoculación.

Las bacterias se cultivaron en TY líquido a 28°C hasta conseguir cultivos frescos a una DO_{600 nm} entre 0,5 – 0,8. A continuación, los cultivos se diluyeron 1/100 en agua destilada estéril, y se mezclaron las estirpes a competir en cada ensayo en proporción 1:1. Posteriormente, se inoculó 1 mL de la mezcla pertinente por tubo. Como control, se empleó una serie de plantas en la que se inocularon la estirpe silvestre SVQ747 y SVQ747 (pGUS3), y una serie de plantas en la que se inoculó sólo SVQ747 (pGUS3) para analizar la frecuencia de pérdida del plásmido informador. Finalmente se incubaron en la cámara de plantas dos semanas más hasta su recogida.

Tabla 4. Combinaciones de estirpes empleadas en cada ensayo de competitividad

Pareja	Estirpe A // Estirpe B
1	<i>E. meliloti</i> SVQ747 // <i>E. meliloti</i> SVQ747 (pGUS3)
2	<i>E. meliloti</i> SVQ749 (pME6863) // <i>E. meliloti</i> SVQ747 (pGUS3) (1)
3	<i>E. meliloti</i> SVQ747 (pME6863) // <i>E. meliloti</i> SVQ747 (pGUS3) (2)
4	<i>E. meliloti</i> SVQ747 (pME6000) // <i>E. meliloti</i> SVQ747 (pGUS3)
5	<i>E. meliloti</i> SVQ749 (pME6000) // <i>E. meliloti</i> SVQ747 (pGUS3)
6	<i>E. meliloti</i> SVQ747 (pGUS3)

Al cabo de las dos semanas, se extrajeron las plantas de los tubos donde estaban contenidas y se lavaron sus raíces manteniéndolas en agua destilada durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se cortó la parte aérea y se introdujeron todas las raíces del mismo tratamiento en botes de vidrio de 5 ml, cubriéndolas con aproximadamente 5 ml de solución X-Gluc recién preparada (Thermo Scientific, 21 mg/40ml, en tampón fosfato sódico 50 mM pH7 y SDS al 1%). Los botes así preparados fueron incubados en oscuridad durante 15 horas a 37°C. Tras este tiempo, se contó el número de nódulos azules y blancos que presentaba cada raíz. Los nódulos ocupados por estirpes marcadas con pGUS3 o ambas cepas presentarían un color azulado, mientras que los nódulos ocupados únicamente por la estirpe no marcada seguirían siendo de color blanco. Finalmente, con los datos obtenidos, se aplicó como test estadístico un ANOVA de un factor ($p < 0,01$) para determinar la capacidad competitiva de cada pareja de estirpes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de estirpes de *E. meliloti* SVQ747 y SVQ749 no productoras de AHL

Para estudiar el papel que juegan las AHL en la simbiosis entre *E. meliloti* SVQ747 y *M. sativa*, se han obtenido estirpes no productoras de AHL mediante conjugación del plásmido pME6863, que porta el gen *aiiA* de *Bacillus spp.* Este gen se encuentra clonado en *EcoRI* bajo control del promotor del gen *lacZ* y codifica una lactonasa de AHL, enzima que rompe el enlace éster del anillo de acil-homoserina lactona, impidiendo así la unión de las AHL a sus reguladores transcripcionales. Transfiriendo este plásmido a *E. meliloti* SVQ749, se obtuvo la estirpe SVQ749 (pME6863), que se empleó junto la estirpe SVQ747 (pME6863) para realizar los ensayos descritos anteriormente. Por otro lado, se generaron estirpes control de SVQ747 y SVQ749 mediante la transferencia del plásmido pME6000, el vector donde está clonado el gen *aiiA* en las estirpes anteriores. Se generaron así las estirpes SVQ747 (pME6000) y SVQ749 (pME6000). El mapa genético del vector pME6000 se muestra en la **Figura 5**.

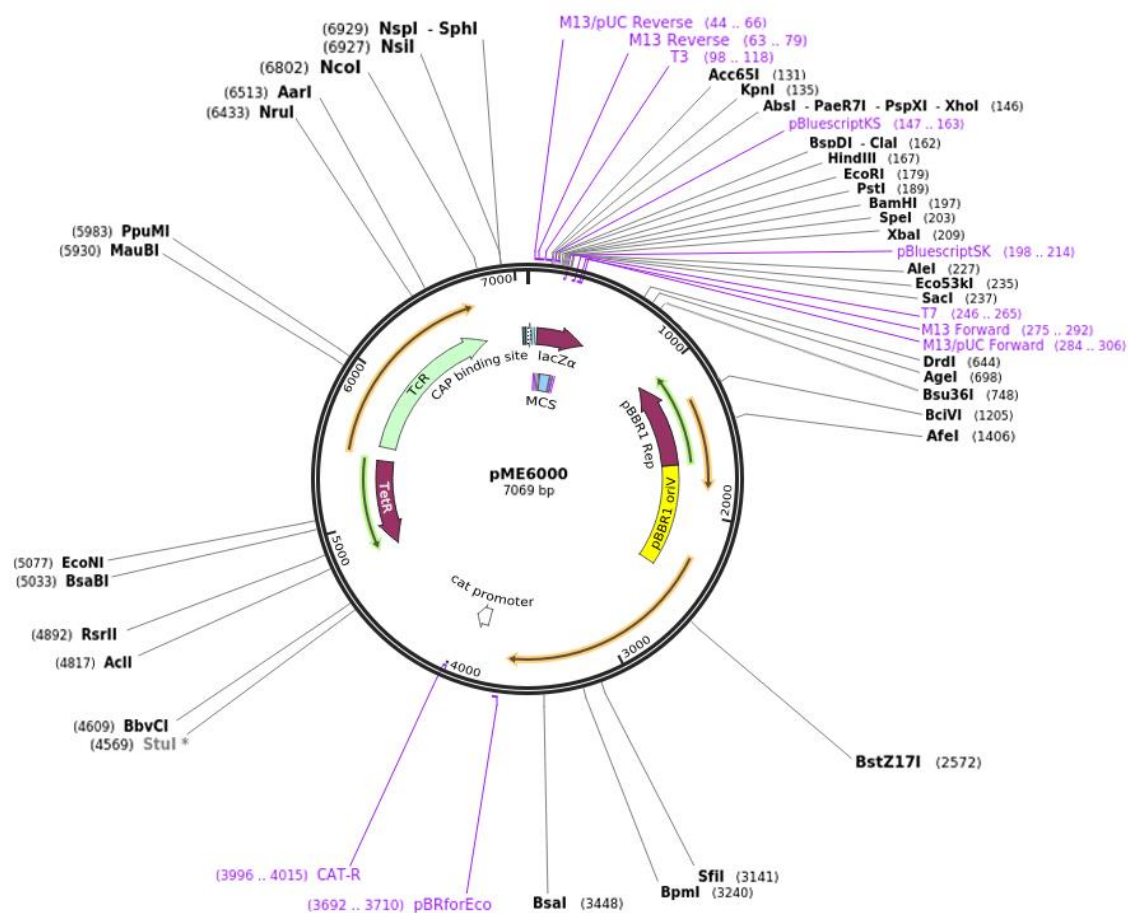


Figura 5. Mapa genético del plásmido pME6000. Figura modificada de Lefebvre y Valvano (2002)

Para comprobar que la transferencia de los plásmidos a sus estirpes receptoras había tenido éxito, se realizó una extracción del ADN plasmídico de los candidatos seleccionados y se observó su presencia en un gel de agarosa (**Figura 6**). Se pudo comprobar que SVQ747 no portaba ningún plásmido mientras que todas las demás estirpes portaban un plásmido de unas 7000-8000 pb, lo que coincide con las 7069 pb del vector pME6000 y las aproximadamente 8000 pb del vector pME6863. El ADN plasmídico obtenido también fue utilizado para detectar por PCR la presencia del gen *aiiA* en aquellos casos en los que se introdujo el vector pME6863 (**Figura 7**). Esto permitió comprobar que los transconjugantes en los que se había introducido el plásmido pME6863 poseían un fragmento de unas 900 pb, compuesto por el gen *aiiA* y sus secuencias flanqueantes en el vector, y que los transconjugantes en los que se había introducido el plásmido pME6000 no contenían dicha banda.

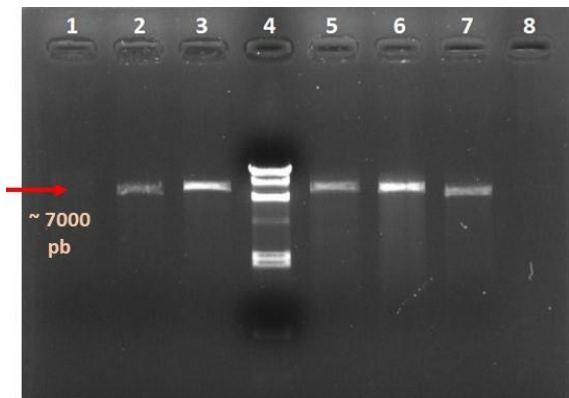


Figura 6. Producto obtenido de la extracción de ADN plasmídico de los candidatos con el gen de la lactonasa y controles en gel de agarosa (0,8%, tampón TAE 0,5%). 1. SVQ747, 2. SVQ747 (pME6000), 3. SVQ747 (pME6863), 4. λ DNA/*Hind*III Marker, 5. SVQ749 (pME6000), 6. y 7. Candidatos 1 y 2 a SVQ749 (pME6863), 8. Control negativo.

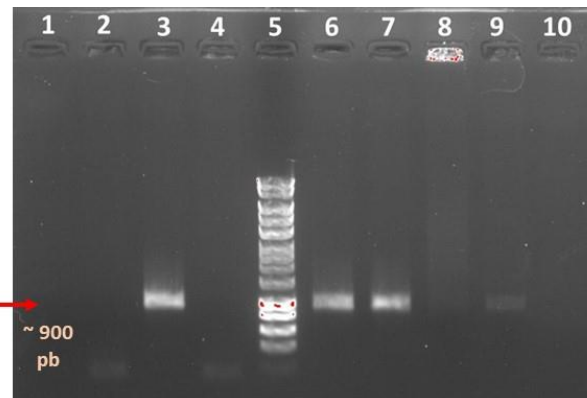


Figura 7. Resultado de la PCR realizada con ADN plasmídico de los candidatos con el gen de la lactonasa y controles en gel de agarosa (0,8%, tampón TAE 0,5%). 1. SVQ747, 2. SVQ747 (pME6000), 3. SVQ747 (pME6863), 4. SVQ749 (pME6000), 5. Marcador de 1 kb, 6. y 7. Candidatos 1 y 2 a SVQ749 (pME6863), 8. Control negativo.

A continuación, se comprobó la capacidad de producción de AHL de cada una de las estirpes obtenidas. Para ello, se realizaron ensayos de difusión en placa de los sobrenadantes producidos durante 3 días por estas estirpes, utilizando como biosensor la estirpe *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4). Como resultado, se observó que tanto SVQ747 y SVQ747 (pME6000) como SVQ749 y SVQ749 (pME6000) producían un halo azul prácticamente similar, mientras que SVQ747 (pME6863) y SVQ747 (pME6863) producía un halo azul apenas apreciable (**Figura 8**). Esto confirma que la acumulación de AHL se reduce en gran medida con la introducción de una proteína con actividad

lactonasa en ambas estirpes, lo que coincide con los resultados obtenidos por Reimann *et al.* (2002), y equivale a anular la función de las AHL-sintasas codificadas por *sinI*. Esta estrategia permite interferir con el sistema de *quorum* de la bacteria, haciendo que la concentración de AI sea más baja que el umbral, lo que alteraría el patrón de expresión de determinados genes. Este tipo de estrategias quedan englobadas bajo el término *quorum quenching* (QQ) (Zhao *et al.*, 2020).

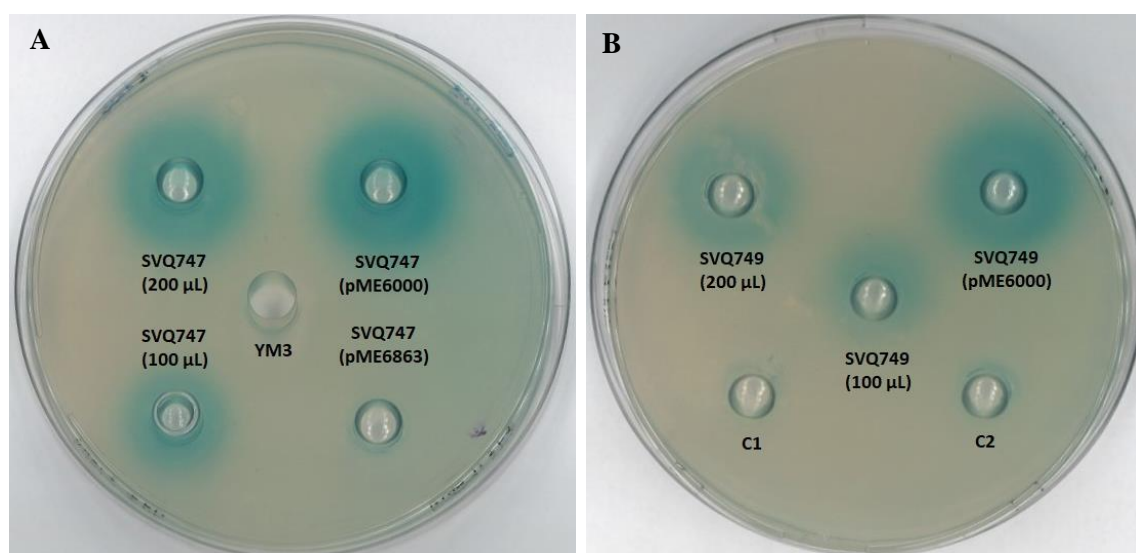


Figura 8. Halo de difusión de AHL en medio YMA de SVQ747 y sus estirpes derivadas (A) y de SVQ749 y sus estirpes derivadas (B) tras 24-48 de incubación, utilizando como biosensor *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4). C1 y C2 son dos candidatos a SVQ749 (pME6863).

Ensayos en placa para el estudio de la movilidad, las características morfológicas de las colonias y la producción de EPS de las bacterias carentes de AHL frente a sus parentales

La movilidad del rizobio podría ser un fenotipo relevante en su capacidad de colonización de la planta. Dado que en *E. meliloti* está sometida a la regulación del sistema ExpR/Sin, se consideró de interés estudiar qué consecuencias tiene la ausencia de AHL en la movilidad tipo *swimming* en SVQ747 y sus derivados. Con este fin, se emplearon placas de medio Bromfield semisólido (agar al 0,3%) y se hizo un seguimiento del diámetro que alcanzaban las colonias al cabo de 6, 8 y 10 días de incubación. En la **Figura 9** se representan los diámetros medios obtenidos por cada estirpe a lo largo de los días, correspondientes a tres réplicas de un solo experimento, y el aspecto de cada estirpe en una de las réplicas. Se observó que SVQ747 (pME6863) y SVQ749 (pME6863), no productoras de AHL, mostraban siempre un diámetro ligeramente mayor que sus respectivas estirpes silvestres, SVQ747 y SVQ749, y que la movilidad de SVQ749 era

mayor que la de SVQ747. No obstante, también se observaron pequeñas diferencias entre las estirpes parentales y las estirpes control, apareciendo una ligera mayor movilidad en SVQ747 (pME6000) respecto a su estirpe parental y una ligera menor movilidad en SVQ749 (pME6000) respecto a su estirpe parental. Todas estas relaciones de tamaño se mantuvieron a lo largo de los días en los que se realizaron las mediciones.

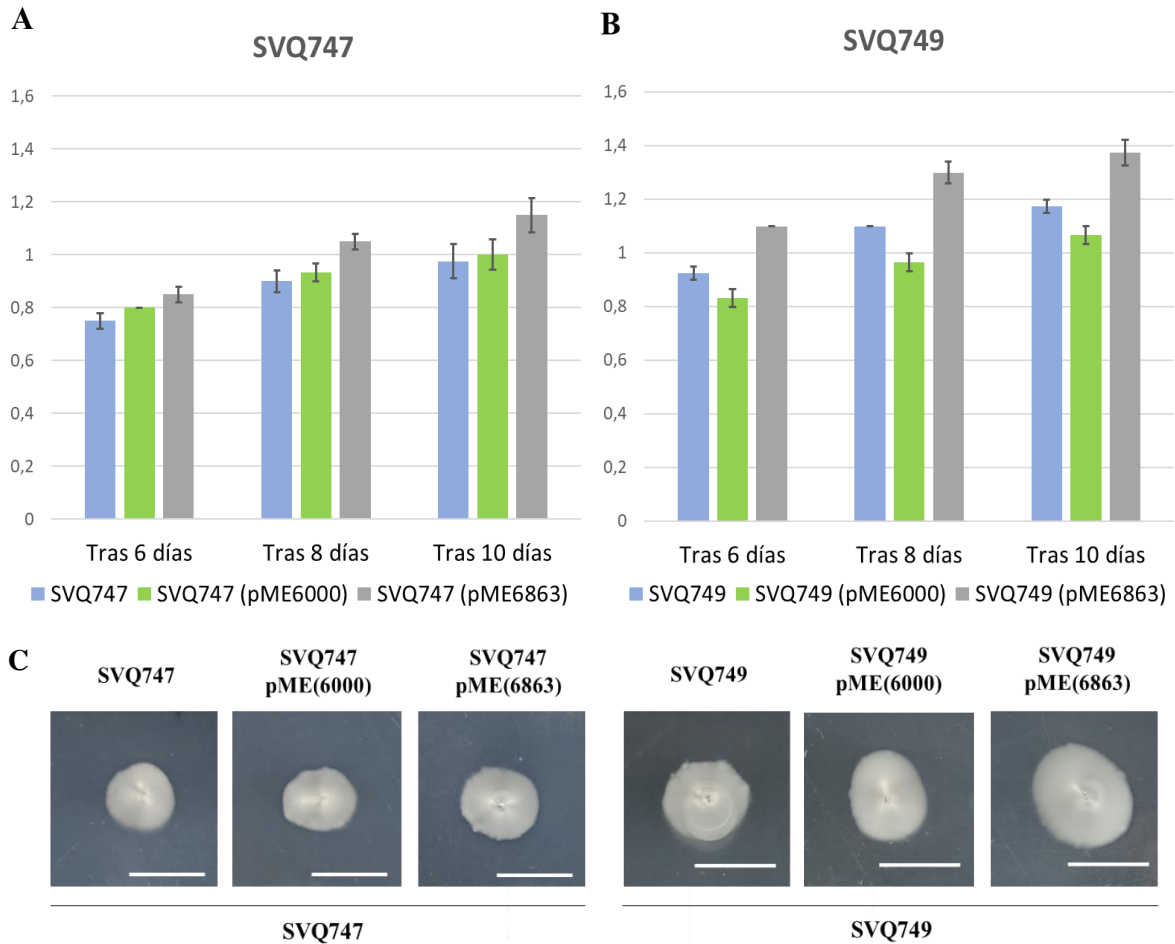


Figura 9. Diámetro medio de los halos de movilidad de *E. meliloti* SVQ747 (A) y *E. meliloti* SVQ749 (B) y sus respectivas estirpes derivadas al cabo de 6, 8 y 10 días, y fotografía de una de sus réplicas al cabo de 8 días (C), en medio Bromfield (0,3% agar). Los datos representan la media \pm SEM (Standard Error of Mean) de los valores obtenidos en tres réplicas de un experimento. Las líneas blancas de las fotografías representan 1 cm de longitud.

La mayor movilidad tipo *swimming* de las estirpes lactonasa respecto a las parentales puede relacionarse con variaciones en la expresión del operón *visN/visR*. Los genes de este operón codifican las subunidades de un activador transcripcional que permite a su vez iniciar la expresión de Rem, una proteína que se une directamente a los promotores de los genes de movilidad y quimiotaxis (entre ellos, *flgB*, *fliB* y *orf38*) para activar su expresión. Estos últimos están implicados en la síntesis de los componentes del

flagelo o en el control de su ensamblaje, por lo que una disrupción en alguno de ellos llevaría a su pérdida y a una reducción de la movilidad (Hoang *et al.*, 2004; Sourjik *et al.*, 2000). Así mismo, se conoce que la expresión del operón *visN/visR* depende de *quorum* ya que, ante altas densidades celulares, las AHL forman un complejo con ExpR, que se activa y adquiere capacidad de unirse al promotor del operón, impidiendo su expresión (Bahlawane *et al.*, 2008) y, como consecuencia, reduciendo la movilidad. Según esta explicación, la ausencia de AHL en las estirpes lactonasa podría favorecer la síntesis de flagelo, lo que permitiría una mayor movilidad que en las respectivas estirpes silvestres.

Por otro lado, la mayor movilidad tipo *swimming* obtenida en SVQ749 respecto a SVQ747 coincide con los resultados obtenidos por Alías-Villegas (2016) y podría deberse a un efecto de la mutación en el gen *nolG*. Al mismo tiempo, la ausencia de AHL aumentaría algo más la movilidad de SVQ749 (pME6863) frente a SVQ749, con lo que se ve reflejado el efecto de las AHL sobre la movilidad. Sin embargo, sería necesario realizar más repeticiones en ambas estirpes para poder ratificar estos resultados.

Paralelamente, se decidió estudiar la morfología que adquirirían las colonias de cada estirpe cuando se cultivaban en medios al 0,3% de agar con diferentes condiciones nutricionales: MM (mínimo) o TY (rico). Para ello, se realizaron tres réplicas de cada estirpe en cada medio. En la **Figura 10**, se muestra el resultado obtenido en MM, similar al obtenido en medio TY, lo que permite deducir que la diferente composición nutricional de estos medios de cultivo no influyó en la apariencia de las colonias. No se pudo observar la movilidad tipo *swimming* en ninguno de los casos dado que quedaba enmascarada por un crecimiento en superficie de las colonias, por lo que el comportamiento fue distinto al descrito en el medio Bromfield, mucho más pobre en nutrientes. En cambio, se observó que, tanto en SVQ747 como en SVQ749, se daba una apariencia más “seca” o menos “fluida” en las estirpes portadoras de la lactonasa que en sus respectivas estirpes silvestres y portadoras del vector pME6000, que tenían un aspecto más fluido. Las estirpes lactonasa también presentaron un diámetro de colonia más pequeño. Estos resultados se podrían achacar a una menor producción de EPS en ausencia de AHL. Así mismo, se observó que las colonias de las estirpes lactonasa no poseían un aspecto uniforme como el de sus parentales, sino que poseían un núcleo más intenso y un borde más claro. Aunque todas las colonias mostraron un crecimiento muy rápido, todas estas diferencias se pudieron contemplar desde las primeras 24 horas y se mantuvieron a lo largo de los días.

Por otro lado, para indagar más sobre los posibles cambios que podían darse en el EPS producido, se estudió la capacidad de unir calcoflúor de las estirpes parentales frente a la de las estirpes con actividad lactonasa bajo luz UV en Medio Mínimo y en medio TY. Aunque en medio TY no se observaron diferencias cuando eran irradiadas, en Medio Mínimo se distinguió una fluorescencia algo mayor en las estirpes lactonasa, tanto en SVQ747 como en SVQ749 (Figura 11).

El fenotipo seco y poco fluido de las estirpes lactonasa ya ha sido observado por otros autores en otras estirpes de *E. meliloti* portadoras de mutaciones en *sinI* o *expR*. Se conoce que, como consecuencia de estas mutaciones, se produce un descenso en la producción de EPSII o galactoglucano, lo que se manifiesta como un cambio de apariencia de la colonia. Se ha descrito también que la activación de ExpR por AHL induce la expresión de genes implicados en la síntesis de EPSII, concretamente *wgeB*, *wgdA*, *wggR* (implicados en la síntesis de la forma de alto peso molecular o HMW de EPSII) y *wgcA* (implicado en la síntesis de la forma de bajo peso molecular o LMW de EPSII) (Janczarek, 2011). Esto podría explicar que las estirpes lactonasa, en ausencia de AHL, experimenten una menor expresión de estos genes, lo que se traduciría en una menor producción de EPSII y un aspecto más seco. Así mismo, una menor producción de EPS podría estar relacionada con un menor diámetro de colonia.

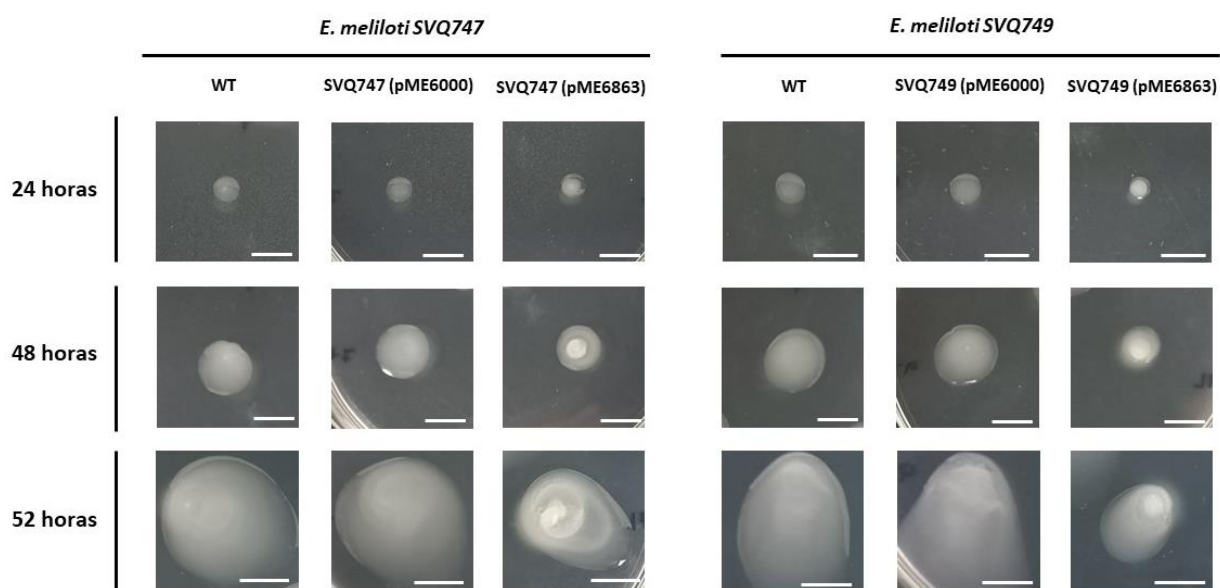


Figura 10. Aspecto de las colonias en medio mínimo (0,3% agar) de *E. meliloti* SVQ747 (izquierda) y *E. meliloti* SVQ749 (derecha) a lo largo de 52 horas. Las líneas blancas representan 1 cm de longitud.

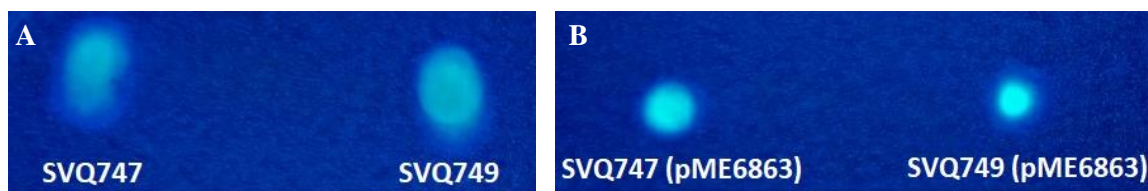


Figura 11. Aspecto bajo luz UV de las colonias en Medio Mínimo (0,3% agar) suplementado con calcoflúor (0,02 %) de *E. meliloti* SVQ747 (A) y *E. meliloti* SVQ749 (B) a las 52 horas de cultivo.

No obstante, ExpR también activa la producción de succinoglicano o EPSI mediante el control de algunos genes *exo*, concretamente *exoI* y *exsH*. Estos genes codifican glucanasas necesarias para la síntesis de la forma LMW del EPSI (Gurich y González, 2009). Así pues, aunque una ausencia de AHL reduciría la síntesis de EPSI y de EPSII, la síntesis de EPSII se vería más afectada que la de EPSI ya que afectaría a la síntesis de las dos formas, LMW y HMW. Esto aumentaría la proporción EPSI : EPSII en las colonias lactonasa y diluiría más la concentración de EPSII. Se podría explicar así una mayor fluorescencia de las estirpes lactonasa bajo luz UV, ya que la capacidad de unión del EPS a calcoflúor se ve aumentada en presencia de EPSI (Rühmann *et al.*, 2015).

Así mismo, según los resultados obtenidos por Nogales *et al.* (2012), en estirpes donde el gen *expR* no se encuentra interrumpido (como es el caso de SVQ747), la producción de EPSII resulta fundamental para una movilidad independiente de flagelo conocida como *sliding*. Este tipo de movilidad se caracteriza por el movimiento pasivo de las células sobre la superficie del agar gracias a la fuerza expansiva del crecimiento de la colonia y la producción regulada por QS de surfactantes (como el EPS) que reducen la tensión superficial del líquido que rodea a la colonia (Calatrava-Morales, 2017). En el caso de las estirpes lactonasa, una menor activación de ExpR llevaría una menor producción de EPSII, y como consecuencia a una menor movilidad tipo *sliding*, siendo esta una de las posibles explicaciones al menor tamaño de colonia de las estirpes lactonasa cuando crecen sobre la superficie.

Estudio de las propiedades simbióticas de las estirpes no productoras de AHL frente a las parentales

Se realizaron experimentos de eficiencia de nodulación y de competitividad por la nodulación de la alfalfa, para detectar si existían diferencias entre los fenotipos simbióticos de las estirpes no productoras de AHL y sus estirpes parentales, y para ver si

estas diferencias podían estar relacionadas con los resultados obtenidos en movilidad y producción de EPS.

Ensayos de eficiencia de nodulación

En la **Figura 12**, se representa el aspecto final de las plantas de alfalfa sometidas a cada tratamiento. En todos los casos se obtuvo un mayor crecimiento que en la planta que no había sido inoculada, que no presentó nódulos. Se puede confirmar así que todas las estirpes conservaron su capacidad para nodular y fijar nitrógeno. Para estudiar las diferencias generadas por cada estirpe, se midieron el peso seco de la parte aérea (PSPA) y el número de nódulos (NN) obtenidos en cada planta y se calculó el promedio de los valores obtenidos en cada tratamiento (**Figura 13**).



Figura 12. Aspecto obtenido en el ensayo de eficiencia de nodulación en una de las réplicas de cada tratamiento tras 8 semanas de incubación desde su inoculación. De izquierda a derecha, se representan: 1. SVQ749 (pME6000), 2. no inóculo (NN), 3. SVQ749 (pME6863), 4. SVQ749, 5. SVQ747, 6. SVQ747 (pME6863), 7. SVQ747 (pME6000).

En cuanto al PSPA (**Figura 13-A**), no se observaron diferencias significativas entre los valores de PSPA obtenidos en las plantas inoculadas con SVQ747 frente a las inoculadas con SVQ749 o con las estirpes portadoras del vector pME6000, aunque se observó un menor peso en las plantas inoculadas con SVQ749 que en las inoculadas con SVQ747. En cambio, se detectó un aumento no significativo del PSPA en las estirpes no productoras de AHL frente a sus parentales. En lo que respecta al número de nódulos (**Figura 13-B**), no se observaron diferencias significativas entre la estirpe parental y sus estirpes derivadas, ni en SVQ747 ni en SVQ749.

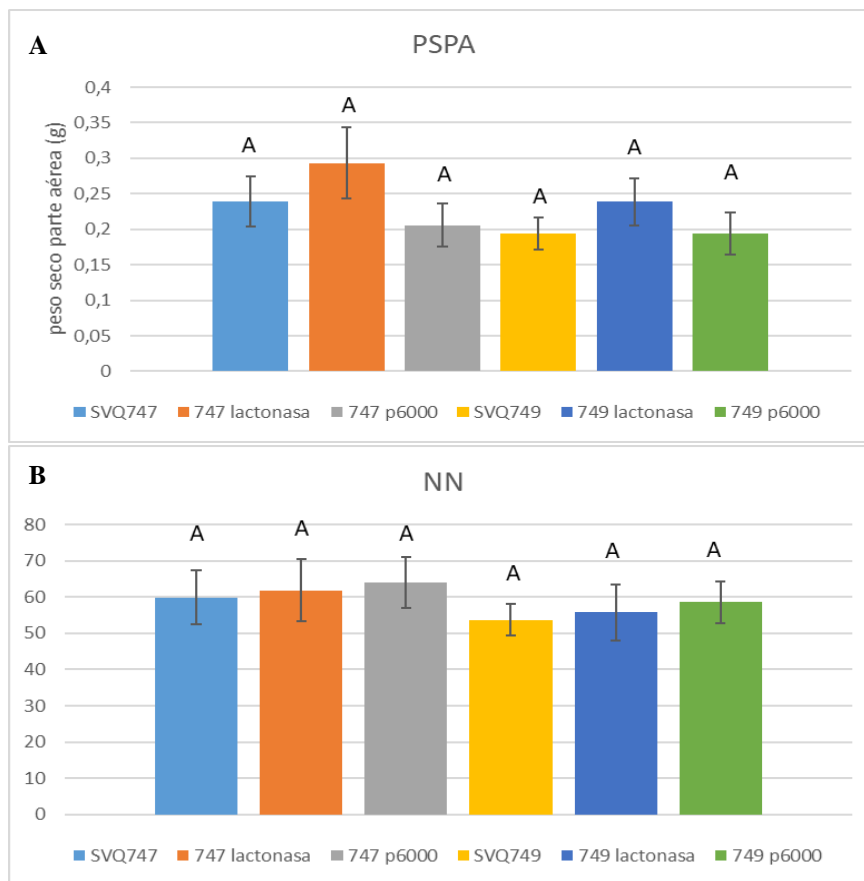


Figura 13. Peso seco de la parte aérea (A) y número de nódulos (B) obtenidos en promedio en cada tratamiento tras 8 semanas de incubación después de la inoculación. Se determinó que no existían diferencias significativas en ningún caso, utilizando como test estadístico ANOVA de un solo factor, con un nivel $p < 0,01$.

La mayoría de los rizobios estudiados hasta ahora presentan una regulación en mayor o menor medida por QS. Por ejemplo, en *E. fredii* SMH12, el QS está involucrado en la formación de *biofilm* alrededor de las raíces de *Glycine max*. En ausencia de AHL, esta estirpe reduce su capacidad de formarlo, lo que le impide una colonización y simbiosis efectivas (Pérez-Montaña *et al.*, 2014). Para la formación de estos *biofilm*, parece necesitarse de un control coordinado de la movilidad y la producción de EPS. En concreto, la síntesis de la forma LMW del EPSII es crucial para la formación *biofilm* (Rinaudi y González, 2009), y una reducción de la movilidad dependiente de flagelo es necesaria para que el flagelo no interfiera con la progresión de la bacteria por el tubo de infección o active más las defensas de la planta (Calatrava-Morales *et al.*, 2018). Aunque según esta lógica el papel de las AHL parece evidente en el establecimiento de la simbiosis, no se llega a las mismas conclusiones en todos los casos. Por ejemplo, en *Ensifer fredii* HH103, las AHL no tienen un papel relevante en la regulación ni de las características importantes para el establecimiento de la simbiosis, ni en la propia simbiosis de esta bacteria con la soja y otras plantas (Acosta-Jurado *et al.*, 2020).

Como se comentó anteriormente sobre nuestros resultados, en las estirpes lactonasa parece apreciarse una menor síntesis de EPSII y una síntesis de flagelo algo mayor, lo que debería traducirse en un empeoramiento de la efectividad de simbiosis. Sin embargo, los datos obtenidos no reflejan diferencias en el número de nódulos tras la inoculación con una estirpe parental o una estirpe lactonasa. Así mismo, aunque el PSPA tampoco parece variar, la ligera ventaja que se aprecia en las estirpes lactonasa sugiere que estos rizobios, formando un número de nódulos similar que sus parentales, son capaces de fijar nitrógeno algo más eficazmente. Esto apuntaría a que las AHL no tienen un papel esencial en la efectividad de simbiosis con *M. sativa*, pero sí cierta influencia negativa.

Otro factor a considerar es que las AHL no solo median comunicación célula-célula, sino que además pueden ser reconocidas por la planta para activar ciertas respuestas en ellas. Además, a diferencia de la bacteria, la planta es capaz de reconocer las AHL independientemente de la configuración del anillo de lactona (íntegro o abierto). Por ejemplo, en *Medicago truncatula*, se ha visto que plantas tratadas con AHL intactas desarrollan un número de nódulos similar a plantas tratadas con AHL de anillo abierto (Palmer *et al.*, 2016), lo que sugiere que la respuesta a AHL es dirigida por la planta y no por mecanismos bacterianos. Según esto, las AHL producidas por las estirpes lactonasa producirían en *M. sativa* los mismos efectos que las AHL íntegras, lo que explicaría que no haya variación en el fenotipo simbiótico. También se ha propuesto que *M. truncatula* pudiera necesitar romper previamente las AHL con acilasas para reconocerlas, algo que ya se ha comprobado en *Arabidopsis thaliana* (Palmer *et al.*, 2014). Si esto ocurriese en *M. sativa*, un encuentro más temprano con AHL de anillo abierto podría adelantar procesos tempranos como el inicio de la infección o la competitividad respecto a la estirpe parental, y generar o no una cierta mejora en la producción de biomasa vegetal.

Ensayos de competitividad por la nodulación de la alfalfa

En la **Figura 14**, se representan los porcentajes de competitividad de cada estirpe frente a la estirpe SVQ747 portadora del vector informador pGUS3. Este análisis se ha realizado a partir de los datos recogidos por el grupo de investigación en otros ensayos y los obtenidos en este trabajo. En lo que respecta al vector pGUS3, se realizó un ensayo de competitividad entre SVQ747 y esta misma estirpe como portadora del plásmido para

determinar su frecuencia de pérdida en SVQ747. Se obtuvo así una frecuencia de pérdida del 4,06%, que se consideró despreciable en la interpretación de los resultados.

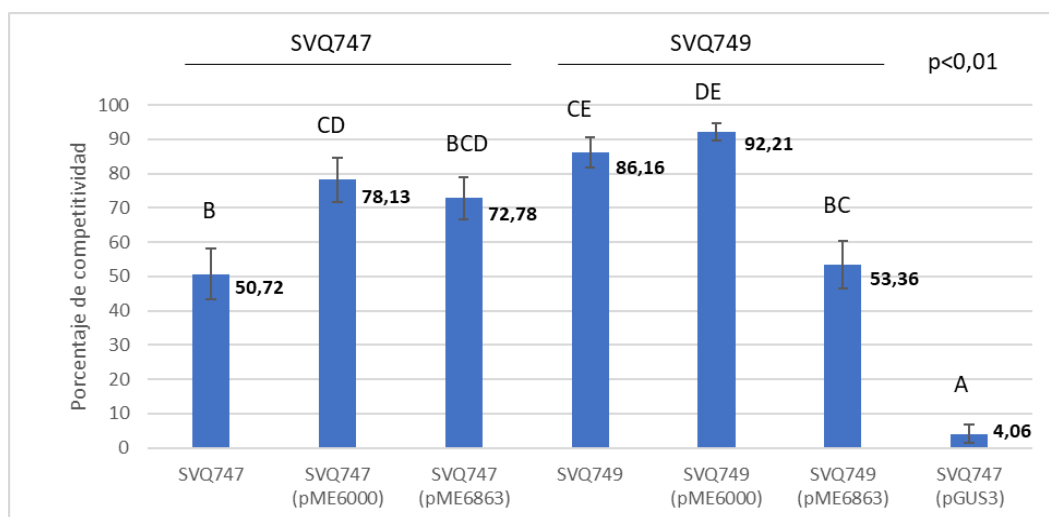


Figura 14. Porcentajes de competitividad obtenidos en ensayos de competición de cada estirpe frente a SVQ747 (pGUS). Para el análisis estadístico de SVQ747, SVQ747 (pME6863), SVQ749 y SVQ747 (pGUS), se han tenido en cuenta todos los datos de competitividad obtenidos por el grupo de investigación y los resultados obtenidos en este trabajo. Para el resto de estirpes, únicamente se han tenido en cuenta los datos realizados en este trabajo. El análisis estadístico se hizo mediante un ANOVA de un factor. Las letras A, B, C, D y E representan diferencias significativas entre estirpes con un nivel $p < 0,01$.

En SVQ747, se detecta un aumento de la capacidad competitiva en SVQ747 (pME6863) (72,79% de ocupación de nódulos, datos de 4 experimentos independientes) frente a SVQ747 (50,72%, media de más de 6 experimentos independientes), lo que indicaría que la ausencia de AHL mejora la capacidad competitiva de esta bacteria. Contradictoriamente, los resultados obtenidos con SVQ747 (pME6000), aunque derivados de un solo experimento, indicarían que la mera presencia del vector la hace más competitiva (78,18% de ocupación de nódulos). No obstante, como se puede comprobar en la **Figura 5**, hay que tener presente que pME6000 porta el gen *tetR*, cuyo producto génico regula un gen de resistencia a tetraciclina (*tcR*) en ausencia de este antibiótico. TetR pertenece a una familia de reguladores transcripcionales generalmente negativos y muy extendidos entre procariontes que regulan resistencia a antibióticos, frecuentemente regulando la expresión de bombas de eflujo, pero también otros mecanismos reguladores, entre ellos el QS (Ramos *et al.*, 2005). De hecho, *LuxR* de *Vibrio fischeri* es un regulador positivo que también pertenece a la familia TetR (Fidopiastis *et al.*, 2002). Habría que investigar si se está dando alguna regulación inespecífica en SVQ747 (pME6000) a través de TetR que la hiciera más competitiva, aunque también sería necesario realizar un mayor número de experimentos de competitividad con esta estirpe.

Por otro lado, al comparar SVQ747 (pME6863) con SVQ747 (pME6000), se observa un descenso, aunque no significativo, de la competitividad de la bacteria portadora del vector pME6863. Como pME6863 también contiene a *tetR*, si esto se cumpliera en más experimentos independientes, significaría que la ausencia de AHL hace a la bacteria ligeramente menos competitiva por la nodulación, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Zatakia *et al.*, (2014), en los que un mutante por delección del gen *sinI* de *E. meliloti* 1021 carece de AHL y es menos competitivo por la nodulación de la alfalfa que el silvestre.

En cuanto a SVQ749, mutante por inserción en la bomba RND NolG, fue también más competitivo por la nodulación de la alfalfa (86,16%, datos de 6 experimentos independientes) que su parental SVQ747 (50,72%), lo que coincide con los resultados obtenidos por Alías-Villegas (2016). Esa mayor competitividad, inexplicada hasta ahora, se incrementó hasta un valor del 92,21% por la presencia del vector pME6000, por lo que se repite un efecto semejante al observado en SVQ747 (pME6000). Sin embargo, la presencia de pME6863 en SVQ749 produjo una bajada mucho más severa y significativa de la competitividad (desde el 86,16 % al 53,37%, media de dos experimentos independientes), igualándola a la capacidad competitiva de la estirpe SVQ747, lo que muestra claramente que la degradación de las AHL disminuye la capacidad competitiva de SVQ749. En este sentido, la mayor competitividad del mutante *nolG* podría deberse a cambios en la producción o el bombeo de AHL a través de una bomba NolG, que podría estar alterada en su conformación como consecuencia de la mutación, permitiendo una mayor salida de AHL al exterior. Cabe destacar que un mutante por delección de *nolG* en SVQ747 no mostró diferencias en competitividad con el parental.

El efecto observado sobre la competitividad por la presencia de pME6000 en SVQ747 o en SVQ749 no fue detectado en la morfología de las colonias ni en la efectividad de la simbiosis con la alfalfa, por lo que este efecto debe ocurrir sobre algún factor importante en los primeros estadios de la simbiosis. Sería conveniente repetir, no sólo los experimentos de competitividad para contar con más réplicas, sino también los de movilidad y morfología de las colonias en presencia de luteolina o de exudados de alfalfa para ver si este efecto tiene alguna relación con la interacción simbiótica con la planta. Sería necesario también analizar más profundamente la producción de AHL por SVQ749.

CONCLUSIONES

1. La acumulación de AHL en SVQ747 y SVQ749 se reduce en presencia de una proteína con actividad lactonasa. Esto permite interferir con el sistema de QS y, en consecuencia, con el control inverso que ExpR hace sobre la movilidad tipo *swimming* y la producción de EPS.
2. La ausencia de AHL parece aumentar ligeramente la movilidad tipo *swimming* de SVQ747 y SVQ749, siendo este último un poco más móvil que SVQ747, lo que podría deberse a un efecto de la mutación en *nolG*.
3. La ausencia de AHL parece reducir la producción de EPS (posiblemente de EPSII) tanto en SVQ747 como en SVQ749, según se observó en las colonias más pequeñas, de aspecto más “seco”, y de una mayor fluorescencia con calcoflúor. Esa supuesta menor producción de EPSII podría afectar a la movilidad de tipo *sliding*.
4. La ausencia de AHL parece no ser esencial en la eficiencia de simbiosis de SVQ747 y SVQ749 con *M. sativa*, ya que no se observaron diferencias significativas ni en el peso seco de la parte aérea, ni en el número de nódulos formados, aunque se observó una tendencia a mejorar el peso seco de la parte aérea en las bacterias no productoras.
5. La mera presencia del vector pME6000 aumenta la capacidad competitiva por la nodulación de SVQ747 y SVQ749, lo que podría relacionarse con efectos mediados por TetR, presente en este plásmido, y perteneciente a una familia de reguladores transcripcionales similares a los del QS. Además, la degradación de AHL disminuyó ligeramente y de forma no significativa la capacidad competitiva de SVQ747, mientras sí lo hizo de forma significativa en SVQ749, recuperando el nivel de competitividad de SVQ747 silvestre. Podría existir, por tanto, una relación entre la mutación que SVQ749 porta en *nolG*, ya sea por la propia bomba o por los efectos mediados por el casete de resistencia a gentamicina y cambios en la producción de AHL por esta bacteria que habría que analizar más profundamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Jurado, S., Alías-Villegas, C., Almozara, A., Espuny, M., Vinardell, J., y Pérez-Montaño, F. (2020). Deciphering the Symbiotic Significance of Quorum Sensing Systems of *Sinorhizobium fredii* HH103. *Microorganisms*, 8(1), 68.
- Alías-Villegas, C. (2016). *Caracterización de rizobios aislados de leguminosas del suroeste de Andalucía e implicación del gen nolG en la simbiosis Ensifer meliloti ORT12 – Medicago sativa* (Tesis doctoral). Universidad de Sevilla, Andalucía, España.
- Alías-Villegas, C., Cubo, M. T., Lara-Dampier, V., Bellogín, R. A., Camacho, M., Temprano, F., y Espuny, M. R. (2015). Rhizobial strains isolated from nodules of *Medicago marina* in southwest Spain are abiotic-stress tolerant and symbiotically diverse. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(7), 506–514.
- Álvarez-Ortega, C., Olivares, J., y Martínez, J. L. (2013). RND multidrug efflux pumps: What are they good for? *Frontiers in Microbiology*, 4(7), 1–11.
- Baev, N., Endre, G., Petrovics, G., Banfalvi, Z., y Kondorosi, A. (1991). Six nodulation genes of *nod* box locus 4 in *Rhizobium meliloti* are involved in nodulation signal production: *nodM* codes for d-glucosamine synthetase. *MGG Molecular & General Genetics*, 228(1–2), 113–124.
- Bahlawane, C., McIntosh, M., Krol, E., y Becker, A. (2008). *Sinorhizobium meliloti* regulator MucR couples exopolysaccharide synthesis and motility. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(11), 1498–1509.
- Behringer, J.E. (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*, 84, 188-198.
- Blair, J. M., y Piddock, L. J. (2009). Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Current Opinion in Microbiology*, 12(5), 512–519.
- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderón, J., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., Bernardini, A., Sanchez, M., y Martinez, J. (2016). Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms*, 4(1), 14.
- Calatrava-Morales, N. (2017). *2-Tridecanona como molécula señal en Sinorhizobium meliloti: impacto en la nodulación de alfalfa e identificación de las bases moleculares implicadas* (Tesis doctoral). Universidad de Granada, Andalucía, España (2017).
- Calatrava-Morales, N., McIntosh, M., y Soto, M. J. (2018). Regulation mediated by *N*-acyl homoserine lactone quorum sensing signals in the rhizobium-legume symbiosis. *Genes*, 9(5), 263.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y. C., Shaw, P. D. y Farrand, S. K. (1998) Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant associated bacteria. *Molecular Plant- Microbe Interactions*, 11, 1119-1129.
- Chan, K. G., Cheng, H. J., Chen, J. W., Yin, W. F., y Ngeow, Y. F. (2014). Tandem mass spectrometry detection of quorum sensing activity in multidrug resistant clinical isolate *Acinetobacter baumannii*. *Scientific World Journal*, 2014, 1-6.

- Charoenpanich, P., Meyer, S., Becker, A., y McIntosh, M. (2013). Temporal Expression Program of Quorum Sensing-Based Transcription Regulation in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal Of Bacteriology*, 195(14), 3224-3236.
- Dilanji, G. E., Teplitski, M., y Hagen, S. J. (2014). Entropy-driven motility of *Sinorhizobium meliloti* on a semi-solid surface. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1784).
- Eda, S., Mitsui, H., y Minamisawa, K. (2011). Involvement of the SmeAB multidrug efflux pump in resistance to plant antimicrobials and contribution to nodulation competitiveness in *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(9), 2855–2862.
- Fernando, D. M., y Kumar, A. (2013). Resistance-Nodulation-Division multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria: Role in virulence. *Antibiotics*, 2(1), 163–181.
- Fidopiastis, P., Miyamoto, C., Jobling, M., Meighen, E., y Ruby, E. (2002). LitR, a new transcriptional activator in *Vibrio fischeri*, regulates luminescence and symbiotic light organ colonization. *Molecular Microbiology*, 45(1), 131-143.
- Figurski, D. H. y Helinski, D. R. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 1648-1652.
- Fuqua, C., y Greenberg, E. (2002). Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(9), 685-695.
- Gurich, N., y González, J. E. (2009). Role of quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *Journal of Bacteriology*, 191(13), 4372–4382.
- Hoang, H. H., Becker, A., y González, J. E. (2004). The LuxR Homolog ExpR, in combination with the sin quorum sensing system, plays a central role in *Sinorhizobium meliloti* gene expression. *Journal of Bacteriology*, 186(16), 5460–5472.
- Janczarek, M. (2011). Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(11), 7898–7933.
- Kan, J., Fang, R., y Jia, Y. (2017). Interkingdom signaling in plant-microbe interactions. *Science China Life Sciences*, 60(8), 785–796.
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 634–644.
- Krol, E., y Becker, A. (2011). ppGpp in *Sinorhizobium meliloti*: Biosynthesis in response to sudden nutritional downshifts and modulation of the transcriptome. *Molecular Microbiology*, 81, 1233-1254.
- Lefebvre, M.A. y Valvano, M.A. (2002). Construction and evaluation of plasmid vectors optimized for constitutive and regulated gene expression in *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 5956-5964.
- Mattingly, A. E., Weaver, A. A., Dimkovikj, A., y Shrout, J. D. (2018). Assessing travel conditions: Environmental and host influences on bacterial surface motility. *Journal of Bacteriology*, 200(11), 1–17.

- Maurhofer, M., Reimmann, C., Schmidli-Sacherer, P., Heeb, S., Haas, D., *et al.* (1998) Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology*, 88, 678–684.
- McIntosh, M., Meyer, S., y Becker, A. (2009). Novel *Sinorhizobium meliloti* quorum sensing positive and negative regulatory feedback mechanisms respond to phosphate availability. *Molecular Microbiology*, 74(5), 1238–1256.
- Nogales, J., Bernabéu-Roda, L., Cuéllar, V., y Soto, M. J. (2012). ExpR Is not required for swarming but promotes sliding in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 194(8), 2027–2035.
- Okazaki, S., Hattori, Y., y Saeki, K. (2007). The *Mesorhizobium loti purB* gene is involved in infection thread formation and nodule development in *Lotus japonicus*. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 8347–8352.
- Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S., y Downie, J. A. (2011). The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45(1), 119–144.
- Palmer, A. G., Mukherjee, A., Stacy, D. M., Lazar, S., Ané, J. M., y Blackwell, H. E. (2016). Interkingdom Responses to Bacterial Quorum Sensing Signals Regulate Frequency and Rate of Nodulation in Legume–Rhizobia Symbiosis. *ChemBioChem*, 17(22), 2199–2205.
- Palmer, A. G., Senechal, A. C., Mukherjee, A., Ané, J. M., y Blackwell, H. E. (2014). Plant responses to bacterial *N*-acyl l-homoserine lactones are dependent on enzymatic degradation to l-homoserine. *ACS Chemical Biology*, 9(8), 1834–1845.
- Pérez-Montaña, F., Jiménez-Guerrero, I., Del Cerro, P., Baena-Ropero, I., López-Baena, F. J., Ollero, F. J., Bellogín, R., Lloret, J., y Espuny, M. R. (2014). The symbiotic biofilm of *Sinorhizobium fredii* SMH12, necessary for successful colonization and symbiosis of *Glycine max* cv Osumi, is regulated by quorum sensing systems and inducing flavonoids via NodD1. *PLoS ONE*, 9(8), 1–11.
- Ramos, J., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A., Terán, W., Watanabe, K., y Zhang, X. *et al.* (2005). The TetR Family of Transcriptional Repressors. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 69(2), 326-356.
- Reimmann, C., Ginet, N., Michel, L., Keel, C., Michaux, P., Krishnapillai, V. *et al.* (2002). Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*, 148(4), 923-932.
- Rigaud, J., y Puppo, A. (1975). Indole-3-acetic Acid Catabolism by Soybean Bacteroids. *Journal of General Microbiology*, 88, 223-228
- Rinaudi, L. V., y González, J. E. (2009). The low-molecular-weight fraction of exopolysaccharide II from *Sinorhizobium meliloti* is a crucial determinant of biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 191(23), 7216–7224.
- Rivas, R., García-Fraile, P., y Velázquez, E. (2009). Taxonomy of Bacteria Nodulating Legumes. *Microbiology Insights*, 2, 51-69.

- Robertsen, B. K., Aiman, P., Darwill, A. G., Mcneil, M. y Albersheim, P. (1981) The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiology*, 67, 389-400.
- Rühmann, B., Schmid, J., y Sieber, V. (2015). Methods to identify the unexplored diversity of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in Microbiology*, 6(565), 1–8.
- Saeki, K. (2011). Rhizobial measures to evade host defense strategies and endogenous threats to persistent symbiotic nitrogen fixation: A focus on two legume-rhizobium model systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(8), 1327–1339.
- Saiki, R. K. (1990) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Editado por Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. y White, T.J. San Diego, California (EEUU): Academic Press.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, E.F. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, EEUU.
- Simon, R., Priefer, U., y Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposons on mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Nature Biotechnology*, 1, 784-791.
- Sourjik, V., Muschler, P., Scharf, B., y Schmitt, R. (2000). VisN and VisR are global regulators of chemotaxis, flagellar, and motility genes in *Sinorhizobium* (Rhizobium) *meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 182(3), 782–788.
- Sourjik, V., y Schmitt, R. (1996). Different roles of CheY1 and CheY2 in the chemotaxis of *Rhizobium meliloti*. *Molecular Microbiology*, 22(3), 427-436.
- Vincent, J.M. (1970). *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. Blackwell Scientific Publication. Oxford, Reino Unido.
- Zatakia, H., Nelson, C., Syed, U., y Scharf, B. (2014). ExpR Coordinates the Expression of Symbiotically Important, Bundle-Forming Flp Pili with Quorum Sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(8), 2429-2439.
- Zhao, X., Yu, Z., y Ding, T. (2020). Quorum-sensing regulation of antimicrobial resistance in bacteria. *Microorganisms*, 8(3), 425.

Figura de la portada (modificada):

- Das, S., Sarkar, H., Uddin, M., Mandal, S., y Sahoo, P. (2018). A chemosensor to recognize *N*-acyl homoserine lactone in bacterial biofilm. *Sensors And Actuators B: Chemical*, 259, 332-338.

Mis agradecimientos al Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología, a mi tutora, María del Rosario Espuny, y a mi codirectora, Cynthia Alías Villegas, así como a los grupos de investigación AGR162 y BIO169 por permitirme llevar a cabo este trabajo de investigación.