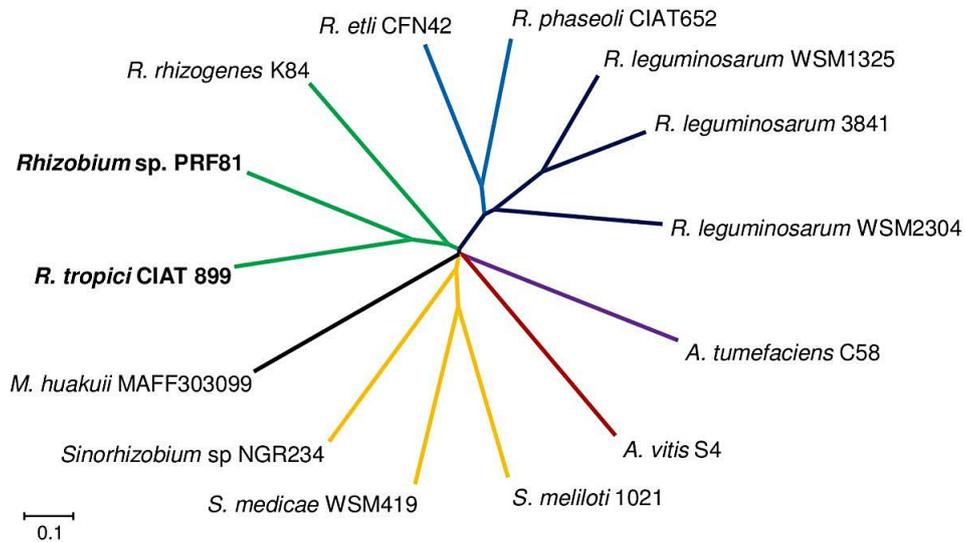


IMPLICACIÓN DEL *QUORUM SENSING* EN LAS PROPIEDADES SIMBIÓTICAS DE *RHIZOBIUM TROPICI* CIAT 899



Trabajo de Fin de Grado

Alicia Auni3n Dom3nguez

Sevilla, Septiembre 2018

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	2
3. OBJETIVOS	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1. Bacterias, medios y condiciones de cultivo	8
4.2 Técnicas para el estudio de los sistemas de QS bacterianos	10
4.3 Estudio de las propiedades simbióticas con <i>P. vulgaris</i> y <i>Leucaena</i> spp.	11
4.4 Obtención de los mutantes para los genes <i>traIA</i> y <i>traIB</i> mediante PCR solapante	13
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
5.1 Ensayos con las plantas	16
5.2 Ensayos β -galactosidasa para la cuantificación de la producción de AHL por distintos mutantes derivados de CIAT 899	19
5.3 Construcción de mutantes por delección de los genes <i>traIA</i> y <i>traIB</i> de CIAT 899 mediante PCR solapante	22
5.3.1 Estudio de la producción de AHL de cepas derivadas de CIAT 899 por delección de los plásmidos a y b	22
6. PERSPECTIVAS DE FUTURO	24
7. CONCLUSIONES	24
8. BIBLIOGRAFÍA	26
8.1 Bibliografía de la portada y el índice no nombradas anteriormente	30



1. RESUMEN

Los rizobios son todas aquellas bacterias residentes en el suelo que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico cuando establecen relaciones simbióticas con plantas leguminosas. Uno de los factores que puede intervenir en el establecimiento de estas relaciones es la percepción de quórum, que se refiere a la capacidad de comunicación que presentan estos organismos unicelulares y que les permite conocer el nivel de densidad celular que existe en la población, para así poder regular un gran número de procesos. Para ello, es necesario que sinteticen una serie de moléculas llamadas autoinductores, que las bacterias expulsarán al medio extracelular para llevar a cabo la comunicación. Este trabajo se centra en el estudio de la percepción de quórum de una estirpe concreta: *Rhizobium tropici* CIAT 899. Se pretende comprobar cuáles son los genes que intervienen en la síntesis de los autoinductores de esta especie, moléculas del tipo acil homoserina lactonas (AHL), así como conocer cuáles son los efectos de la alteración en la producción de estas moléculas en la simbiosis con judía (*Phaseolus vulgaris*) y leucena (*Leucaena spp.*)

2. INTRODUCCIÓN

El término “Quorum sensing” (QS) apareció por primera vez en una revisión realizada por Fuqua, Winans y Greenberg, publicada en el Journal of Bacteriology en 1994 (Barreto, 2011) y corresponde al término en inglés que hace referencia a la capacidad de las bacterias para conocer su densidad de población y, en función de su número, regular la expresión de determinados genes. Los procesos regulados por QS suelen implicar comportamientos multicelulares (como el crecimiento y el desarrollo de “biofilms”), interacciones entre bacterias o interacciones de bacterias con sus hospedadores eucarióticos.

La señalización mediante QS requiere la síntesis, intercambio y percepción de compuestos bacterianos denominados autoinductores (AI) o moléculas señal de QS, que se sintetizan de forma constitutiva a una velocidad muy baja. Sin embargo, en el momento en el que la población aumenta, las concentraciones de AI alcanzan un valor umbral que permite al resto de bacterias detectar una concentración celular crítica y, en respuesta, interaccionar con los genes diana para poner en marcha la expresión de genes necesaria para llevar a cabo una función concreta. Al alcanzar ese valor umbral, un factor de transcripción (proteína R) interacciona con el AI e induce la transcripción de los genes regulados por la percepción de quórum, pero también los genes clave para la síntesis del

autoinductor (gen I), de forma que se crea un bucle de retroalimentación positiva que acelera la respuesta (Waters y Bassler, 2005). Esquemático en la Figura 1a se muestra el caso de *Vibrio fischeri*.

Mientras que la mayoría de las bacterias Gram positivas usan AI de tipo peptídico, las bacterias Gram negativas usan *N*-acil homoserina lactonas (AHL) como AI (Figura 1b), moléculas formadas por un anillo lactona hidrofílico y una cadena carbonada de diferente longitud (C4 a C18) que le da a la molécula una gran hidrofobicidad. El carbono 3 puede no estar sustituido, sustituido con un grupo carbonilo o hidroxilado, e incluso a veces se encuentran dobles enlaces en la cadena lipídica. En los últimos años se han descrito otras moléculas usadas como AI en muchas bacterias (Brameyer *et al.*, 2015), y algunos ejemplos se muestran en la Figura 1b: el autoinductor-2 de *V. harveyi* (AI-2), quinolonas (PQS), el ácido metil dodecanoico, el éster metílico del ácido hidroxil-palmítico (PAME) y el péptido autoinductor 1 (AIP-1) de *Staphylococcus aureus*.

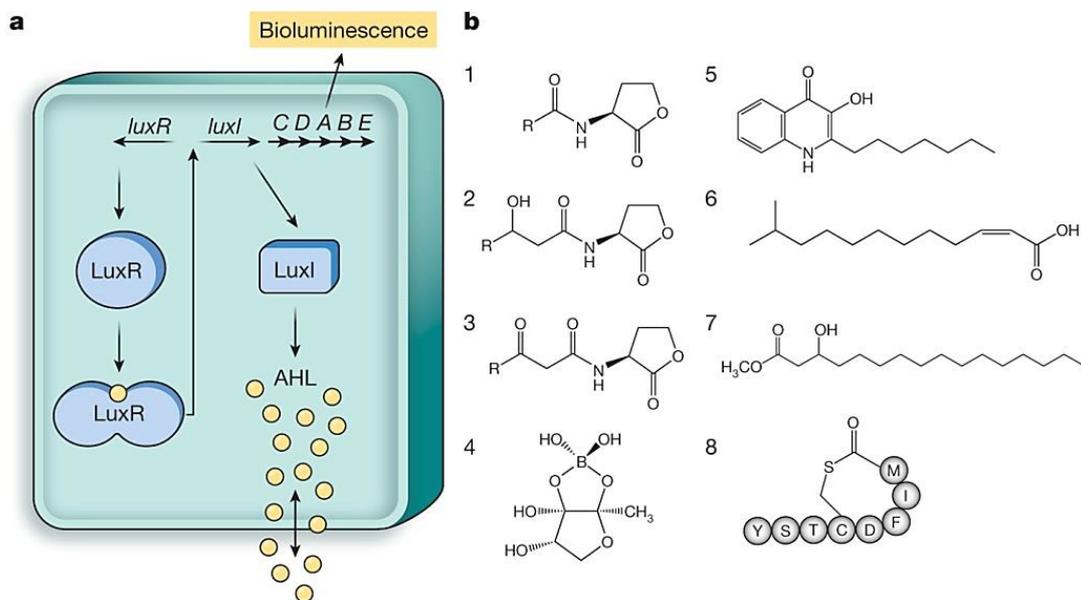


FIGURA 1. a) Detección de quórum en *V. fischeri*. LuxI produce 3-oxo-C6-HSL (AHL, esferas amarillas), que interactúa específicamente con el regulador transcripcional LuxR, lo que conduce a la expresión del operón *luxICDABE* y la bioluminiscencia. b) Ejemplos de señales QS de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. (1) *N*-acil homoserina lactona (AHL). (2) *N*-(3-hidroxiacil) homoserina lactona (3-hidroxi-AHL). (3) *N*-(3-oxoacil)-*L*-homoserina lactona (3-oxo-AHL). (4) El autoinductor-2 (AI-2) de furanosil borato de *V. harveyi* (5) Las quinolonas de *Pseudomonas* (PQS), 2-heptil-3-hidroxi-4 (1H)-quinolona. (6) Ácido metil dodecanoico. (7) Éster metílico del ácido hidroxil-palmítico (PAME). (8) Péptido autoinductor 1 (AIP-1) de *Staphylococcus aureus*; las letras dentro de las bolas indican aminoácidos de este péptido cíclico, pequeña señal de QS (Whiteley *et al.*, 2017).

Diferentes especies bacterianas pueden producir las mismas AHL o AHL con estructuras y propiedades similares, lo que sugiere que se produce una comunicación entre poblaciones. Se ha visto que la detección de quórum a través de AHL es más común entre las bacterias asociadas a las plantas que en la población general de bacterias del suelo. Además, en el suelo, los microorganismos forman comunidades en las que los productores de AHL interactúan con bacterias capaces de degradar estas moléculas y, por lo tanto, interfieren con la detección del quórum. Las enzimas que degradan AHL se denominan lactonasas o acilasas en función de su modo de acción, y se han encontrado en diferentes especies de bacterias del suelo, como en el fitopatógeno *Agrobacterium tumefaciens*. En esta bacteria la transferencia por conjugación de su plásmido Ti, que porta la mayoría de los determinantes de patogenicidad, está regulada por el sistema de QS constituido por los genes *traI* (sintetasa de la 3-oxo-octanoilhomoserina lactona (3-oxo-C8-HSL)) y *traR*. Además, presenta un gen *traM* (que se une al regulador TraR bloqueando su unión a 3-oxo-C8-HSL) y dos genes que sintetizan lactonasas que degradan la 3-oxo-C8-HSL. Todo ello indica que la transferencia del plásmido Ti está regulada por diversos factores entre los que son importantes la densidad celular y otros compuestos de la planta como las opinas (Dessaux y Faure, 2018).

En las bacterias Gram negativas asociadas a las plantas, el QS mediado por AHL es empleado tanto por bacterias simbióticas como por patógenas o de control biológico para regular fenotipos como la virulencia, la competencia en la rizosfera, la conjugación, la secreción de enzimas hidrolíticos y la producción de metabolitos secundarios (González y Venturi, 2013). No obstante, además de intervenir en la comunicación entre las comunidades bacterianas, las AHL influyen sobre los hospedadores eucarióticos induciéndoles diferentes cambios fisiológicos y actuando como señales entre reinos. Se ha descrito que, en las plantas, la respuesta a las AHL depende de la longitud de la cadena del ácido graso (Mathesius *et al.*, 2003; Zarkani *et al.*, 2013).

A las bacterias que en ausencia de nitrógeno combinado pueden fijar nitrógeno atmosférico (N₂) en simbiosis con plantas leguminosas se les denomina rizobios. Se trata de bacterias Gram negativas pertenecientes al *phylum Proteobacteria*. En comparación con otros géneros, los rizobios producen una gran variedad de moléculas de AHL. Las AHL sintetasas pueden catalizar la producción de AHL a partir de dos sustratos: *S*-adenosil-L-metionina (SAM), que proporciona el anillo de homoserina lactona, y una proteína transportadora de grupos acilos (acyl-ACP) procedentes de la biosíntesis de ácidos grasos,

que es el precursor de la cadena lateral de acilo graso. De esta forma, existen una gran diversidad de AHL en función de la cadena lateral (Calatrava-Morales *et al.*, 2018).

En la asociación con la leguminosa, la bacteria induce en la planta el desarrollo de un nuevo órgano denominado nódulo, en cuyo interior se produce la fijación biológica del N₂. La interacción comienza con un diálogo molecular entre la planta y el rizobio que conlleva la expresión coordinada de un gran número de genes. La formación del nódulo implica un reconocimiento específico entre la bacteria y la planta, la invasión de las células de la planta por la bacteria y otros cambios en la estructura y bioquímica de ambos organismos (Masson-Boivin *et al.*, 2009; Oldroyd *et al.*, 2011).

Las raíces de las leguminosas liberan flavonoides, compuestos aromáticos que atraen específicamente a los rizobios que, como respuesta, sintetizan y secretan los factores de nodulación, lipoquitooligosacáridos, LCO o factores Nod (NF), que inician la cascada de cambios transcripcionales sobre las raíces de las plantas compatibles (Wasson *et al.*, 2006; Oldroyd, 2013; Liu y Murray, 2016). Estos cambios permiten a los rizobios entrar en las células radicales donde se diferencian a bacteroides, células especializadas en la fijación de N₂ que son mantenidas por los fotosintatos de la planta. El proceso se resume en la Figura 2.

Los NF están constituidos por 4 a 5 unidades de N-acetil-glucosamina, con un ácido graso de distinta longitud sustituyendo a la molécula del extremo no reductor y varias otras sustituciones, específicas de especie, tanto en el extremo reductor como en el no reductor (Dénarié *et al.*, 1996). Mientras los genes comunes *nodABC* son los responsables de la síntesis del esqueleto de los factores Nod, son los denominados genes *nod* específicos los que modifican el esqueleto cambiando la longitud o saturación del ácido graso, o añadiendo grupos acetilos, metilo, carbamoilos, sulfato o glicosilos. Las variaciones estructurales de los NF son uno de los determinantes de la especificidad de hospedador (Perret *et al.*, 2000; D’Haeze y Holsters, 2004), aunque también son importantes en la determinación de la especificidad los polisacáridos superficiales, exopolisacáridos, lipopolisacáridos y los polisacáridos capsulares (Fauvart y Michiels, 2008; Gibson *et al.*, 2008).

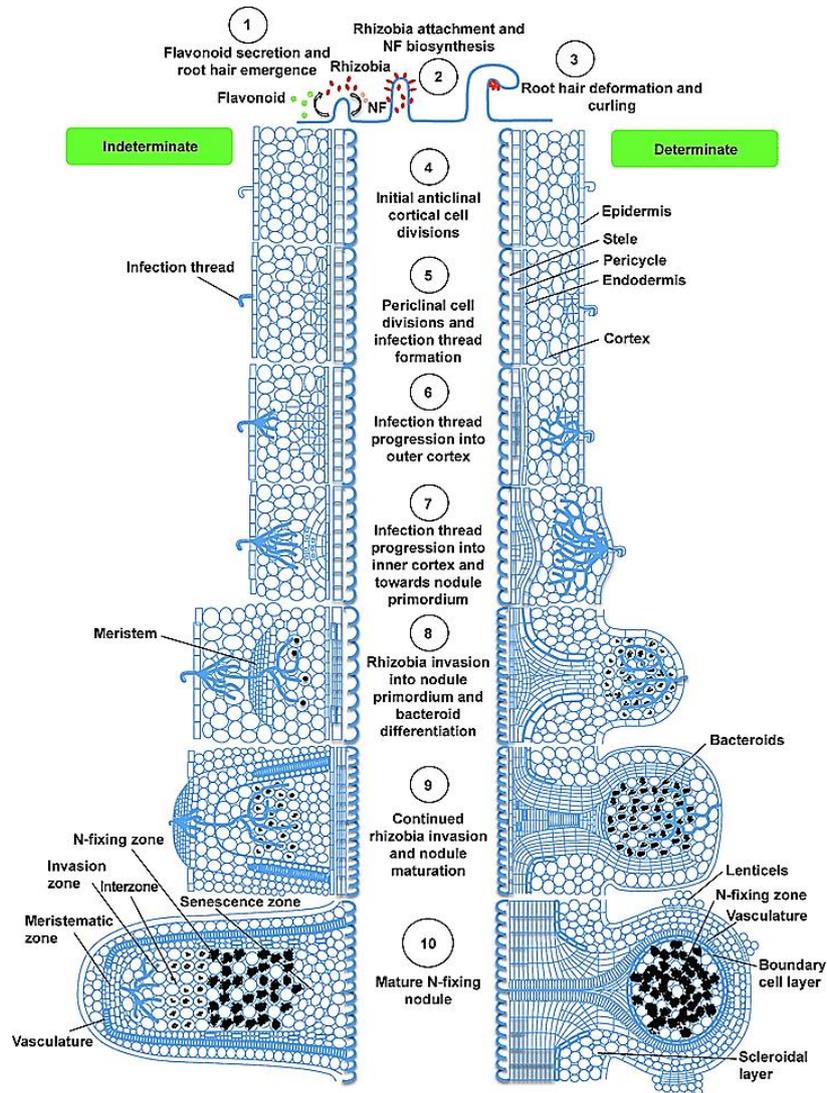


FIGURA 2. Etapas de desarrollo de los nódulos de guisante (indeterminado, izquierdo) y de soja (determinado, derecho). Los pelos de la raíz emergentes exudan flavonoides, que atraen rizobios compatibles y los estimulan a producir factores de nodulación (NF). El pelo radicular se deforma y forma un bolsillo, en el cual los rizobios quedan atrapados. El tubo de infección se inicia en el bolsillo permitiendo que los rizobios entren en la planta. Los tubos de infección avanzan hacia el primordio nodular y liberan los rizobios que posteriormente se diferencian en bacteroides que fijan nitrógeno (Ferguson *et al.*, 2010).

Un punto clave en la interacción rizobio-leguminosa es la inducción de la expresión de los genes *nod* mediada por las proteínas NodD, reguladores transcripcionales que, una vez activados por los flavonoides, se unen a las denominadas cajas *nod*, motivos conservados corriente arriba de los operones *nod* (Long, 1996). Las proteínas NodD de diferentes rizobios reconocen diferentes flavonoides, lo que supone otro nivel de especificidad (Peck *et al.*, 2006).

Numerosos trabajos han demostrado que, además de las señales simbióticas ya mencionadas, la regulación mediante QS es un elemento más en el proceso de intercambio

de señales, jugando un papel importante en la preparación y coordinación de los rizobios durante el establecimiento de la simbiosis (González y Marketon, 2003).

Este trabajo se centrará en estudiar el QS de *R. tropici* CIAT 899, un rizobio singular por presentar un amplio rango de nodulación que incluye a *Leucaena leucocephala*, *Lotus japonicus* y *Macroptilium atropurpureum*, además de *Phaseolus vulgaris*; por ser una bacteria altamente tolerante a factores ambientales, como altas temperaturas, acidez o salinidad, y por producir una gran variedad de factores Nod. Cabe destacar que CIAT 899 produce factores Nod incluso en ausencia de flavonoides en condiciones de estrés abiótico como la acidez o la alta concentración de sal (Guasch-Vidal *et al.*, 2013). Se sabe que, cuando CIAT 899 es cultivado en presencia de sal o apigenina (un flavonoide inductor de genes *nod* de CIAT 899), existen similitudes en los patrones de activación de genes simbióticos importantes (Pérez-Montaña *et al.*, 2016).

Gracias a la secuenciación del genoma de esta estirpe y de trabajos anteriores, se sabe que CIAT 899 cuenta con cinco genes *nodD* diferentes: *nodD1* a *nodD5*. De los cinco, *nodD1* parece ser el más importante simbióticamente y se encuentra cercano al operón *nodABC*. Es el responsable de la activación de los genes de nodulación en presencia de flavonoides purificados y de exudados de raíces o semillas de *P. vulgaris*, *L. leucocephala* y *M. atropurpureum*. De forma contrapuesta, *nodD2* está implicado en la activación de los genes de nodulación en condiciones de estrés salino de una manera independiente del flavonoide (Del Cerro *et al.*, 2017; Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012). Así, las mutaciones en cada uno de los genes *nodD* han puesto de manifiesto que *nodD1* es necesario para nodular *L. leucocephala*, *L. japonicus* y *M. atropurpureum*; pero el mutante en *nodD1* sigue nodulando *P. vulgaris* y *L. burtii*. Por otro lado, el mutante en *nodD2* produce menos nódulos en *P. vulgaris*, lo que sugiere que puede tener un papel en la simbiosis. En cuanto al resto de los genes *nodD*, *nodD3* y *nodD5* fueron identificados como activadores de *nodD1*, mientras que *nodD4* podría actuar como activador o represor en función del ambiente (Del Cerro *et al.*, 2015b, 2015a).

También es importante destacar que todos los sistemas de secreción T4SS de tipo F (conjugativos) identificados en los genomas de CIAT 899 incluyen los genes *traI*, *traR* y *traM*, lo que indica que están regulados por mecanismos de QS mediante AHL. Así, se han encontrado dos copias del gen *traI*: *traIA*, que se encuentra en el plásmido a, y *traIB*, localizado en el plásmido b (el simbiótico). Un hecho llamativo es la localización de una secuencia de inserción (IS256) inserta corriente arriba de *traR* del plásmido simbiótico

de la bacteria, lo que puede haber alterado su promotor conduciendo a la represión constitutiva del sistema de conjugación de dicho plásmido (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012; Del Cerro *et al.*, 2017).

En este trabajo se pretende conocer de qué manera afectan las condiciones del medio de cultivo a la síntesis de AHL en CIAT 899 y varios tipos de mutantes, concretamente aquellos que tienen afectado alguno de los cinco genes *nodD* y uno que cuenta con un gen de lactonasa introducido. Por otro lado, con un test en judía y otro en leucena se podrá comparar hasta qué punto la ausencia de AHL provocada por la actividad lactonasa puede interferir en el proceso de nodulación, por lo que se comparará el grado de nodulación de CIAT 899 con el del mutante con el gen de la lactonasa.

3. OBJETIVOS

1. Conocer el papel del QS mediado por AHL en la simbiosis de CIAT 899 con judía y leucena.
2. Conocer los tipos de AHL sintetizadas por CIAT 899.
3. Comprobar si la producción de AHL está regulada por alguno de los genes *nodD* descritos en CIAT 899.
4. Diseño de estrategias para la mutación de los genes de síntesis de AHL descritos en el genoma de CIAT 899.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Bacterias, medios y condiciones de cultivo

Para llevar a cabo el ensayo se utilizaron las bacterias y los plásmidos reflejados en la Tabla 1. Los rizobios se cultivaron a una temperatura de 28°C en los medios de cultivo TY o YM (Tabla 2). Este último fue suplementado, cuando fue necesario, con el flavonoide apigenina, inductor de los genes de nodulación de CIAT 899 (1 µg/mL), o con 300 mM de NaCl. En ocasiones fue necesario utilizar antibióticos, reflejados en las características de las estirpes utilizadas (Tabla 1). Las estirpes de *E. coli* fueron cultivadas a 37°C en medio LB (Tabla 2). El pH de todos los medios de cultivo se ajustó a 6,8-7,0 y se esterilizaron en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de presión (121°C).

Tabla 1. Estirpes bacterianas y plásmidos utilizados durante este trabajo.

<i>Rhizobium tropici</i>	Características relevantes	Referencia
CIAT 899 WT	Estirpe silvestre; Rif50	Martinez <i>et al.</i> , 1985
CIAT 899 (pME6863)	CIAT 899 WT portadora del plásmido con el gen de la lactonasa <i>aiiA</i> ; Rif50, Tc10	Cedida por Del Cerro (sin publicar)
CIAT 899 NodD1-	CIAT 899 WT con el interposón Ω en el gen <i>nodD1</i> (Km30)	Guasch-Vidal <i>et al.</i> , 2013
CIAT 899 NodD2-	CIAT 899 WT con el interposón Ω en el gen <i>nodD2</i> (Spc100)	Del Cerro <i>et al.</i> , 2015b
CIAT 899 NodD3-	CIAT 899 WT con el interposón Ω en el gen <i>nodD3</i> (Spc100)	Del Cerro <i>et al.</i> , 2015a
CIAT 899 NodD4-	CIAT 899 WT con el interposón Ω en el gen <i>nodD4</i> (Spc 100)	Del Cerro <i>et al.</i> , 2015a
CIAT 899 NodD5-	CIAT 899 WT con el interposón Ω e el gen <i>nodD5</i> (Spc 100)	Del Cerro <i>et al.</i> , 2015a
CIAT 899 NodD12-	CIAT 899 WT con los genes <i>nodD1</i> y <i>nodD2</i> delecionados	Del Cerro <i>et al.</i> , 2017
CIAT 899 NodD123-	CIAT 899 WT con los genes <i>nodD1</i> , <i>nodD2</i> y <i>nodD3</i> delecionados	Cedida por Del Cerro (sin publicar)
RSP900	CIAT 899 WT curada del plásmido b (simbiótico). RifR50	Vargas <i>et al.</i> , 1990
SVQ587	RSP 900 curada del plásmido a. RifR50	Cedida por Espuny (sin publicar)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Características relevantes	Referencia
NT1 (pZRL4)	<i>A. tumefaciens</i> curada del plásmido pTiC58; <i>traG::lacZ</i> , <i>traR</i> ; Gm30	Cha <i>et al.</i> , 1998
<i>Escherichia coli</i>	Características relevantes	Referencia
DH5 α	<i>SupE44</i> , <i>ΔlacU169</i> , <i>5hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-I</i> , <i>relA1</i> , <i>Nx^R</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
Plásmidos	Características relevantes	Referencia
<i>pK18mob:sacB</i>	<i>lacZ'</i> , <i>Km^R</i> , <i>sacB</i>	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
Gm30, resistente a 30 μ g/mL de gentamicina; Rif50, resistente a 50 μ g/mL de rifampicina; Tc10, resistente a 10 μ g/mL de tetraciclina; Km30, resistente a 30 μ g/mL de kanamicina; Spc100, resistente a 100 μ g/mL de espectinomicina.		
Tabla 2. Medios de cultivo para las bacterias		
Medio YM (Vincent, 1970)		
K ₂ HPO ₄	0,5 g	
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g	
NaCl	0,1 g	
Extracto de levadura	0,4 g	
Manitol	10 g	
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L	
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	

LB (Maniatis <i>et al.</i> , 1982)	
Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
NaCl	5 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

4.2 Técnicas para el estudio de los sistemas de QS bacterianos

Para cuantificar la producción de AHL por las distintas bacterias, se obtuvieron los sobrenadantes de cada una de ellas mediante centrifugación a 13000 rpm de cultivos de 5 días en los distintos medios (YM10, YM3, YM3 suplementado con el flavonoide apigenina (1 µg/mL) e YM3 con NaCl a una concentración de 300 mM); previamente se midió la densidad óptica alcanzada por el cultivo a 600 nm (DO600nm) para comprobar que estaba suficientemente crecidos (valores entre 0,5 y 1,0). Los sobrenadantes así obtenidos se congelaron a -20°C.

La cuantificación de la producción global de AHL por las distintas bacterias se determinó midiendo la capacidad de inducción de la actividad β-galactosidasa de los distintos sobrenadantes obtenidos sobre la bacteria biosensora NT1 (pZLR4) mediante el método desarrollado por Miller (1972). Con este objetivo, 2 mL de YM3 suplementado con gentamicina (30 µg/mL) fueron inoculados con 250 µL de un cultivo NT1 (pZLR4), a los que se añadieron 100 µL de los sobrenadantes obtenidos anteriormente y se cultivó a 28°C en agitación durante aproximadamente un período de 20 horas. Pasado ese tiempo se midió la DO a 600nm, debiendo oscilar la absorbancia entre 0,15-0,4. Como control negativo se usaron 100 µL de medio YM3 y como control positivo 100 µL H₂O con 3 ng de 3-oxo-C8-HSL.

Para llevar a cabo el ensayo de la β-gal se mezclaron 200 µL de cada cultivo con 800 de µL tampón Z (Tabla 3), 10 µl de SDS 0,1% y 20 µl de cloroformo, para luego agitar la mezcla en un vórtex durante 10-20 segundos y favorecer la lisis celular. Para comenzar la reacción se añadieron 200 µL de ONPG (4 mg/mL de tampón Z), y cuando las reacciones adquirieron un color amarillo (aproximadamente 10 a 15 minutos) se detuvieron con 500 µL de Na₂CO₃ 1M. Finalmente se midió la DO a 420 nm.

Tabla 3. Composición del tampón Z.

Tampón Z	
Na ₂ HPO ₄ H ₂ O	16,68 g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	6,24 g
KCl	0,75 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,25 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1L

La actividad β-galactosidasa en unidades Miller se calculó mediante la siguiente fórmula, donde t es el tiempo transcurrido desde la adición de ONPG hasta la detención de la reacción:

$$U (Miller) = \frac{1000 * DO_{420}}{DO_{660} * t (min) * V células (ml)}$$

Para separar y conocer los distintos tipos de AHL producidos por CIAT 899, se empleó la cromatografía en capa fina (TLC). Se obtuvieron sobrenadantes de las bacterias crecidas durante 3 días en 15 ml de medio YM3, y se extrajeron dos veces con medio volumen de diclorometano acidificado con ácido fórmico (0,1%). Tras esto, se evaporaron los extractos de diclorometano hasta sequedad y se resuspendieron en 150 µl de acetato de etilo acidificado (100x). Para cada bacteria se cargó un volumen adecuado del concentrado en la TLC (HPTLC plates RP-18 F254S 1.13724 y 1.05559, Merck) y se usó metanol:agua (60:40 v/v) como fase móvil. Por último, se dejó secar la placa TLC.

Tras la separación de las AHL, su detección se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Cha *et al.* (1998). Para ello, las placas de TLC se revelaron con *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4). Se mezclaron 20 mL de YM3 al 1,2% de agar, con 10 mL de cultivo del biosensor crecido hasta fase estacionaria y 160µl de X-Gal (40 mg/mL dimetilformamida). Tras esto, se vertió la mezcla sobre la placa TLC que previamente fue colocada en placas de Petri cuadradas del tamaño adecuado. Se dejó en incubación durante 48 horas a 28° C.

4.3 Estudio de las propiedades simbióticas con *P. vulgaris* y *Leucaena* spp.

Para el crecimiento de las plantas se utilizó la solución de Fåhraeus (Tabla 4), que carece de nitrógeno combinado.

Tabla 4. Soluciones nutritivas utilizadas en el estudio.

Solución de Fåhraeus (Vincent, 1970)	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,12 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O/Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,15 g/0,075 g
Citrato férrico	1 mL
Solución de Gibson	1 mL
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

El pH del medio se ajustó a 6,5 -7,0 y posteriormente se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 °C).

El citrato férrico se preparó disolviendo con calor 5 g/L de citrato férrico en agua destilada.

Solución de micronutrientes de Gibson	
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	0,13 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

Las semillas de *P. vulgaris* se desinfectaron mediante un tratamiento con alcohol de 96° durante 1 minuto, seguido de otro con lejía comercial durante 6 minutos. Tras ello, las semillas se lavaron con abundante agua destilada estéril, hasta que el pH del agua de lavado alcanzó un valor de 7. Las semillas de *Leucaena spp.* se desinfectaron con un tratamiento de sulfúrico durante 20 minutos, seguido con otro con lejía comercial durante 12-15 minutos. Finalmente, las semillas se lavaron como anteriormente, y se colocaron en placas con agar-agua (0,8% de agar) en oscuridad y a 28°C hasta su germinación.

Las semillas ya germinadas se transfirieron a un sistema estéril denominado jarro de Leonard (Vincent, 1970). El sistema consiste en un depósito de 1,5 L aproximadamente que contiene la solución de Fåhraeus, y sobre ese depósito se colocó una maceta con 800 cm³ de vermiculita mezclada con perlita [vermiculita:perlita (2:1)] y humedecidas con 250 ml de la misma solución nutritiva. La maceta y el depósito se conectaron mediante una mecha de algodón de aproximadamente 20 cm de longitud. Los jarros se esterizaron en autoclave durante 20 minutos, a una atmósfera de presión (121°C). En cada uno se colocaron 2-3 semillas de leucena o judía, según el caso, y cada una de las semillas fue inoculada con 1 mL del cultivo bacteriano que correspondiera cuando presentaba una DO600 nm de aproximadamente 0,5. Se prepararon 5 jarros

inoculados con CIAT 899, 5 jarros inoculados con CIAT 899 (pME6863) y otros 5 jarros se dejaron sin inocular. Las plantas de judía permanecieron en la cámara durante un mes, mientras que las de leucena permanecieron dos meses.

Pasado ese tiempo, se cortó la parte aérea de las plantas y se extrajeron los nódulos de las raíces, se contaron y pesaron. La parte aérea de las plantas se secaron en una estufa de desecación a 80°C durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo se dejaron otras 24 horas con el horno apagado y, posteriormente, se pesaron para obtener el peso seco.

4.4 Obtención de los mutantes para los genes *traIA* y *traIB* mediante PCR solapante

Para generar mutaciones por delección en los genes *traIA* y *traIB* se utilizó la técnica de la PCR solapante, básicamente siguiendo el método descrito por Camacho y Casadesús (2005). Este método consta de dos fases: en la primera se realizan dos PCR independientes, cada una con un cebador externo a la región a amplificar (1 para una de las regiones y 4 para la otra) y uno interno que contiene oligonucleótidos complementarios al otro cebador interno (2 y 3, respectivamente). Los fragmentos amplificados se purificaron tras comprobar su tamaño en un gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE 0,5%.

En la segunda fase, los dos fragmentos amplificados fueron sometidos a una segunda PCR en la que los cebadores iniciales fueron los dos oligonucleótidos más externos (1 y 4). De nuevo, el producto se purificó en un gel de agarosa. La técnica se ilustra en la Figura 3.

Los cebadores externos utilizados para *traIA* fueron (1) 5'-AGA GGA ATT CAT GAT GTT GAG CCG AGA C-3' / (4) 5'-GAG TCT AGA CTC CAT CAA TGC GGT CAA-3'; mientras que los de *traIB* fueron (1) 5'-AAG CTT GAC CGC ACA TAT TCT TCC-3' / (4) 5'-TCT AGA GAA GCC ATC GAA TTA GCG-3'. Estos cebadores presentan sitios de corte para las enzimas de restricción *EcoRI/XbaI* e *HindIII/XbaI*, respectivamente. Por otro lado, los cebadores internos utilizados en *traIA* fueron (2) 5'-TGC CGC TCA ACA AAT TCA ATG GTC CGC T-3' / (3) 5'-AGC GGA CCA TTG AAT TTG TTG AGC GCG A-3'; y para *traIB* (2) 5'-CGA TAT CGA CCA GAG AAT TCA TCT CCC C-3' / (3) 5'-GGG GAG ATG AAT TCT CTG GTC GAT ATC G-3'.

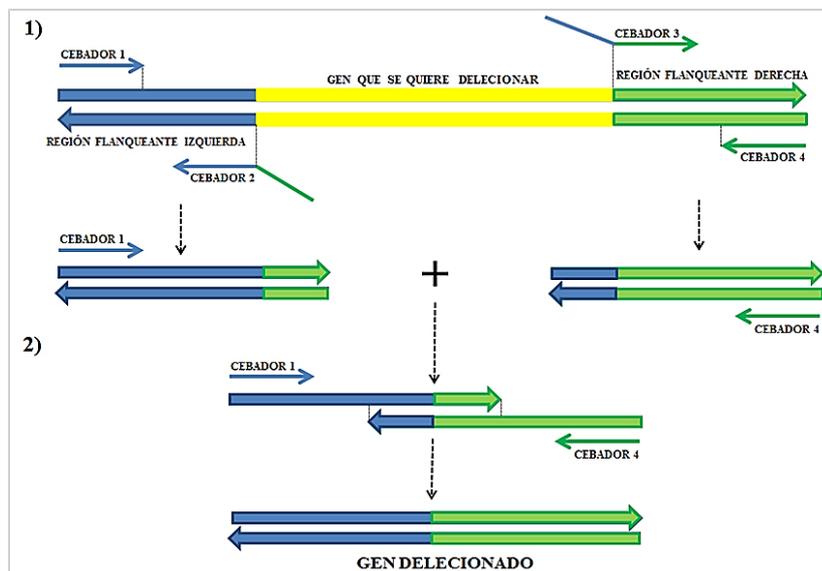


FIGURA 3. Esquema de la mutagénesis *in vitro* por deleción mediante PCR solapant (Jiménez, 2015)

Los productos finales se clonaron en el plásmido pK18*mob:sacB* (Schäfer *et al.*, 1994) tras ser digeridos todos ellos con las enzimas de restricción adecuadas en cada caso. Posteriormente, se transformó el plásmido así construido en *E. coli* DH5 α (Sambrook *et al.*, 1989). Para terminar, se sembraron en una placa de LB con Km (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y con X-gal (30 μL de una solución de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de dimetilformamida). Tras la incubación, se seleccionaron y purificaron las colonias de color blanco. Por último, se realizó la transferencia de los plásmidos obtenidos desde *E. coli* a *R. tropici* CIAT 899 mediante conjugación triparental, utilizando para ello a *E. coli* con el plásmido auxiliar pRK2013. Los transconjugantes, CIAT 899 portadoras del plásmido construido, fueron seleccionados en medio TY con kanamicina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y rifampicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

El plásmido pK18*mob:sacB* lleva el gen *sacB*, que induce la muerte de los rizobios en un medio con sacarosa. Así, se picaron colonias de *Rhizobium* en placas de TY con kanamicina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y TY con sacarosa al 12'5%, de forma que aquellas colonias que crecieran con el antibiótico pero no lo hicieran con sacarosa serían las que tendrían el plásmido correcto.

Los métodos empleados en este apartado se detallan a continuación:

Amplificación del ADN por PCR. Se realizó siguiendo el protocolo descrito por Saiki en 1990. Los programas usados en cada caso siguen el siguiente esquema común:

1. Desnaturalización del ADN a 95-98 °C durante 2-5 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 (Tib Molbiol) durante 30 segundos.
4. Polimerización del ADN a 72 °C variando el tiempo de polimerización en función del tamaño del ADN a amplificar (1 minuto/kb).
5. Repetición del ciclo de polimerización (desde el paso 2), 35 veces más.
6. Polimerización del ADN a 72 °C durante 2-5 minutos.

El volumen de la mezcla de reacción varió dependiendo del experimento. Como norma general, 25 µL de mezcla reacción contenían los cebadores usados a una concentración de 0,2 µM, dNTPs a 0,2 mM, tampón de PCR 1X y 0,1 U de Taq polimerasa.

Electroforesis del ADN. Se llevó a cabo en geles de agarosa, preteñidos con bromuro de etidio, desde el 0,6% hasta el 1,5% (m/v) en tampón TAE 0,5X dependiendo del peso molecular de los fragmentos que se quisieron identificar (Maniatis *et al.*, 1982). Las muestras de ADN mezcladas con el tampón de carga se añadieron a los pocillos del gel. Como patrones de referencia se usaron diferentes marcadores de peso molecular. La electroforesis se llevó a cabo utilizando el aparato Mupid-21 (Cosmo Bio) a 50 ó 100 V. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV a 260 nm. A continuación se capturaron las imágenes utilizando el aparato de captación de imágenes Gel Doc XR+ (Bio-Rad).

Soluciones empleadas:

Tampón TAE	Tris-HCl 30mM, 0,002% (v/v) EDTA 0,5M pH 8, ácido acético glacial 0,00114% (v/v). Ajustar el pH a 8.
Tampón de carga	Azul de bromofenol 0,25% (m/v), xileno cianol FF 0,25% (m/v), glicerol 30% (v/v).

Purificación del ADN. Se llevó a cabo a partir de la purificación directa de lo obtenido a partir de la PCR o recuperando el material genético del gel de agarosa. Para recuperar el ADN de un gel de agarosa, se cortó la porción de éste que contenía la banda deseada. En ambos casos el ADN se purificó mediante el kit Wizard SV gel and PCR clean-up system siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ligación del ADN. Para clonar un fragmento de ADN en un vector, las moléculas de ADN ya digeridas con las enzimas de restricción adecuadas y purificadas se mezclaron en las proporciones adecuadas y se les añadió 1/10 del volumen final del tampón de

ligación y 1 μL (1 U/ μL) de la ligasa de T4 (New England Biolabs). La mezcla se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente. Los productos de la reacción se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli*.

Transformación bacteriana. El producto de la ligación fue añadido a bacterias competentes por tratamiento con cloruro de litio y, tras incubar el cultivo en hielo durante 20 minutos, fue sometido a un choque térmico a 42°C durante 90 segundos. Luego permaneció de nuevo en hielo durante 5 minutos. Para que las bacterias se recuperaran se inocularon en LB líquido y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Para terminar, se sembraron en una placa de LB con Km (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y con X-gal (30 μl de una solución de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de dimetilformamida). Tras la incubación, se seleccionaron y purificaron las colonias de color blanco.

Extracción del ADN plasmídico. La extracción de plásmidos se realizó utilizando el kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Conjugación bacteriana. Se mezclaron 800, 100 y 200 μL , respectivamente, de cultivos crecidos con los antibióticos adecuados de *Rhizobium* (receptor), *E. coli* (pRK2013), portadora del plásmido auxiliar, y *E. coli* DH5 α , portadora del plásmido a transferir. Se centrifugaron juntos y, posteriormente, las células sedimentadas se resuspendieron en 800 μL de H₂O estéril y se volvieron a centrifugar para poder eliminar el antibiótico de cada medio. Tras esto, las células se depositaron en forma de gota en una placa de TY para formar un parche de conjugación, favoreciendo así el crecimiento de *Rhizobium*. El resultado de la conjugación fue sembrado en césped en una placa de TY para seleccionar a todos los rizobios que hubieran incorporado el plásmido.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Ensayos con las plantas

En la Figura 4 se muestran los resultados de los test de nodulación de judía y leucena, y en la Figura 5, el aspecto de las plantas al final de los ensayos. Como se puede apreciar, CIAT 899 (pME6863) desarrolló un significativamente menor número de nódulos en las plantas de judía que provocaron una disminución, también significativa, del peso seco de la parte aérea de la planta. Sin embargo, eso no ocurrió en el caso de la leucena, en la que no se apreciaron diferencias ni en el número de nódulos ni en el peso seco de la parte aérea frente a la estirpe silvestre. La presencia del gen que codifica la lactonasa reduce las posibilidades de la misma de nodular en la planta. Como

consecuencia, la planta no dispondrá de todo el nitrógeno que necesita para un crecimiento adecuado, como se puede apreciar en el caso de la judía. Por el contrario, en leucena no se observan dichos resultados, lo que podría ser debido a un tiempo de crecimiento insuficiente.

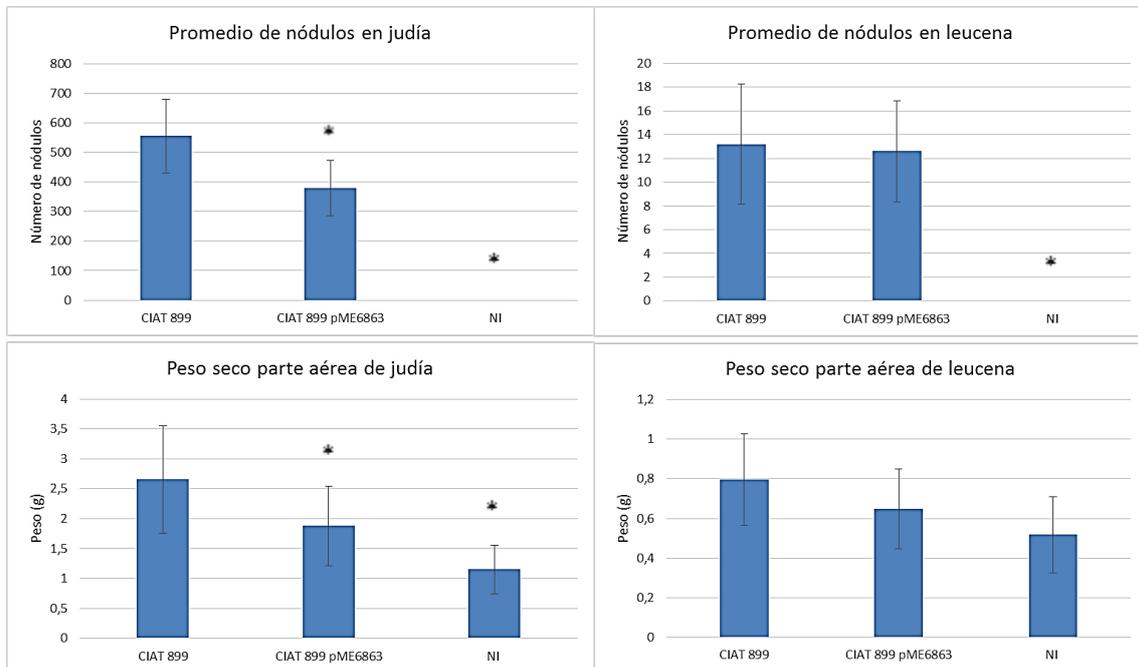


FIGURA 4. Diferencias entre la producción de nódulos y el peso seco de la parte aérea de las plantas de leucena y judía al ser inoculadas con CIAT 899 o CIAT 899 (pME6863). Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas al nivel $\alpha = 5\%$ con respecto a CIAT 899 utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Plantas sin inocular: NI.

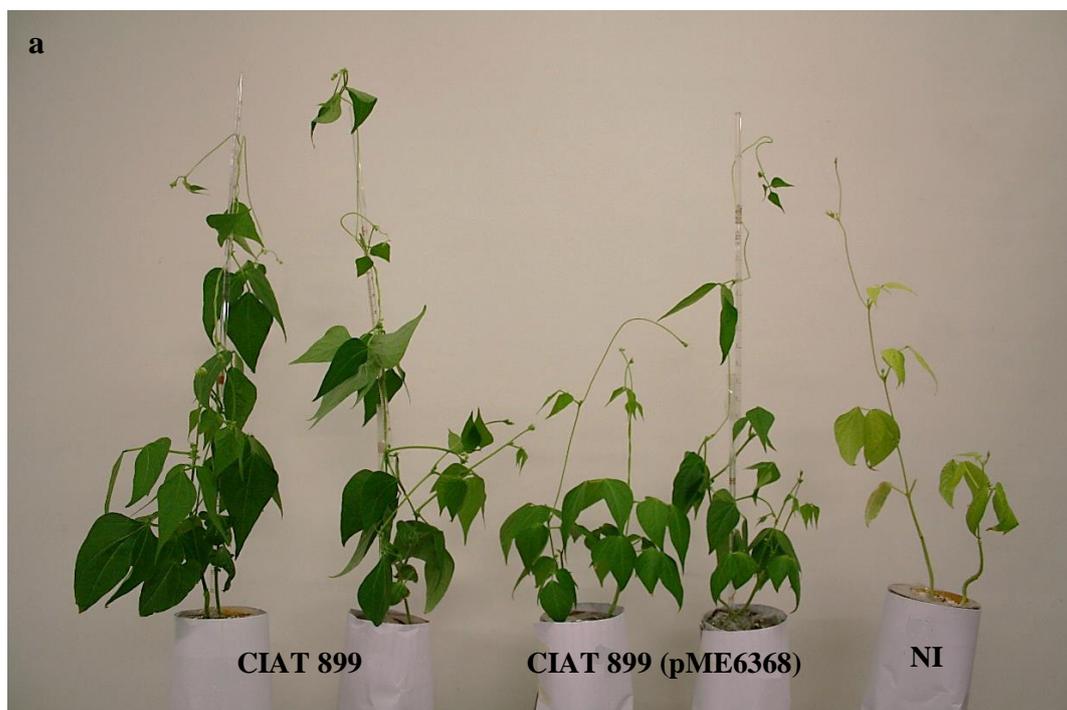




FIGURA 5. a) Imagen del test de nodulación en judía. De izquierda a derecha: 2 plantas inoculadas con CIAT 899, 2 plantas inoculadas con CIAT (pME6863) y 1 planta sin inocular **b)** Imagen del test de nodulación en leucena. De izquierda a derecha: planta sin inocular, planta inoculada con CIAT 899 (pME6368) y planta inoculada con CIAT 899.

Las AHL rizobiales pueden considerarse señales simbióticamente importantes, aunque en algunos casos su contribución es sutil y puede reflejar diferencias relacionadas con el metabolismo de las AHL en lugar de mecanismos reguladores directos. En general, el papel de la regulación de QS en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa sigue siendo desconcertante pero, aunque está claro que el control de la expresión génica dependiente de la densidad de población afecta a comportamientos importantes en los rizobios, la regulación mediada por AHL no siempre es esencial para la simbiosis, como se puede observar en el caso de CIAT 899 con la planta de leucena. De hecho, numerosos estudios han comprobado que las mutaciones en genes similares de diferentes especies de rizobio tienen efectos distintos sobre la interacción con sus leguminosas hospedadoras, e incluso dentro de la misma especie se puede encontrar un rango diferente de sistemas QS (Calatrava-Morales *et al.*, 2018). Así, en el caso de *Mesorhizobium tianshanense* CCBAU060A, mutantes defectivos en la producción de AHL también mostraron la reducción del número de nódulos en *Glycyrriza uralensis* (Cao *et al.*, 2008). Igualmente, mutantes de *R. etli* CNPA para el gen *cinI* sólo estaban afectados en la actividad reductora de acetileno de sus nódulos, sin afectar significativamente al desarrollo de la planta de judía, aunque sus ensayos fueron de pocos días (21 días) (Daniels *et al.*, 2002), y en el caso de *S. fredii* SMH12 tanto el mutante en *traI* como el silvestre portador del gen de la lactonasa presentaron una reducción de la nodulación de la soja, sólo significativa en el caso de la bacteria con la lactonasa. No obstante, la mutación en *rail* de *R. etli* provocó un aumento en la nodulación (Rosemeyer *et al.*, 1998). Esta diversidad sugiere que no puede haber un paradigma unificador de lo que está controlado por QS en estas bacterias,

aunque todas presentan la característica común de que todas las AHL sintasas y reguladores de respuesta identificados en rizobios pertenecen a las familias de proteínas LuxI y LuxR respectivamente (Calatrava-Morales *et al.*, 2018).

5.2 Ensayos β -galactosidasa para la cuantificación de la producción de AHL por distintos mutantes derivados de CIAT 899

En la Figura 6 se muestran los resultados de la producción de AHL por la estirpe CIAT 899 silvestre y sus respectivos mutantes (CIAT 899 (pME6863), *nodD1*, *nodD2*, *nodD3*, *nodD4*, *nodD5*, *nodD12* y *nodD123*) en diferentes medios de cultivo. Como se puede observar, CIAT 899 (pME6863), como cabía esperar, no produjo o a muy bajo nivel AHL en ninguna de las condiciones; el mutante en *nodD1* presentó una disminución en la producción frente a la estirpe silvestre en todas las condiciones, siendo más acusada en presencia de apigenina. Esta menor producción de AHL también se observó en el doble mutante *nodD1D2* (y el triple mutante *nodD1D2D3*), aunque la disminución por la presencia de la apigenina también se observó en la estirpe silvestre. También se observaron diferencias en el mutante *nodD5* cuando crecía en YM3, y en el triple mutante *nodD123* cuando crecía con sal.

En cuanto a los medios de cultivo en sí, se puede apreciar que una mayor concentración de manitol (YM10) no influyó en la producción de AHL. Por el contrario, se apreció un aumento en dicha síntesis cuando las bacterias crecieron con altas concentraciones de sal, y una ligera disminución con apigenina. Este último resultado indicaría que la presencia de la planta (apigenina) parece inhibir de alguna manera la producción de AHL, por lo que la producción óptima de AHL es dependiente de NodD1, pero se vería disminuída cuando NodD1 “se une” al flavonoide inductor.

A la vista de los resultados, se seleccionaron a los mutantes *nodD1* y *nodD2* para continuar su estudio en mayor profundidad. Los resultados obtenidos tras cinco ensayos β -galactosidasa, independientes cada uno con sus tres réplicas, se muestran en la Figura 7. Se observa una disminución significativa en la producción del mutante *nodD1* en todos los medios, a excepción de las bacterias crecidas en un medio con apigenina, pero esa menor producción no fue significativa en el mutante *nodD2*. Es por ello que se realizaron comparaciones de la producción de AHL llevada a cabo por la estirpe silvestre en los diferentes medios (Figura 8), de forma que se puede apreciar que, a pesar de que la producción de AHL aumenta notablemente con sal, es con apigenina cuando la disminución es relevante. La menor producción de AHL debida al flavonoide no guarda

relación con la menor eficiencia simbiótica de CIAT 899 (pME6863), salvo que la producción de AHL se vea rectificada por otros componentes de los exudados de la planta diferentes a la apigenina.

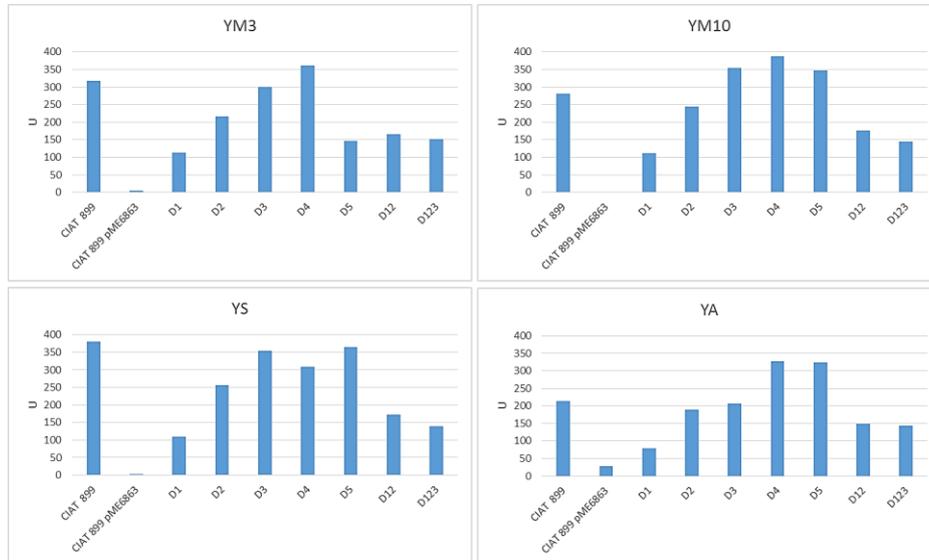


FIGURA 6. Diferencias en la producción de AHL expresadas en unidades Miller (U) en los distintos medios de cultivo de CIAT 899 y los mutantes CIAT 899 (pME6863), *nodD1*, *nodD2*, *nodD3*, *nodD4*, *nodD5*, *nodD12* y *nodD123*. Las bacterias se cultivaron en los medios YM3 (medios YM con 3g de manitol), YM10 (medio YM con 10g de manitol), YS (medio YM3 con 300 mM NaCl) e YA (medio YM3 con apigenina).

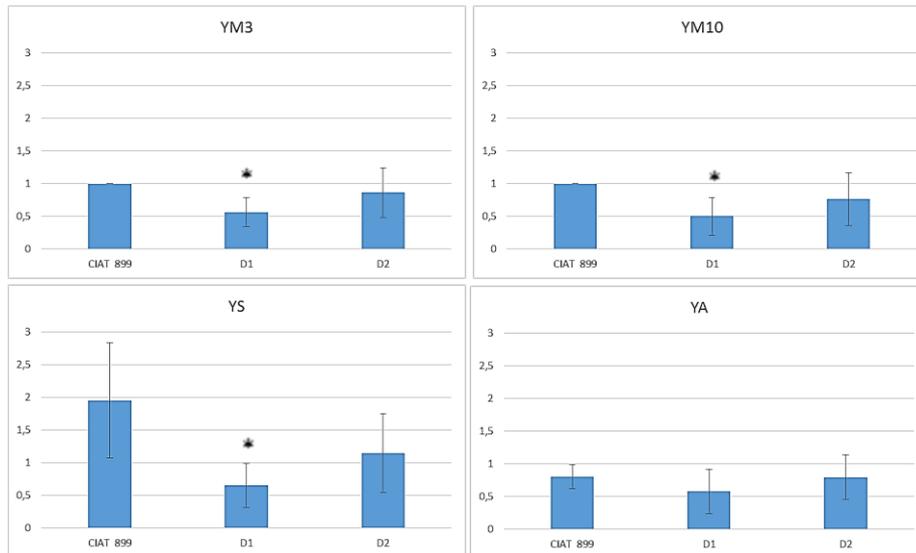


FIGURA 7. Diferencias en la producción de AHL en los distintos medios de cultivo de CIAT 899 y los mutantes CIAT 899 *nodD1* y *nodD2*. Los valores de producción han sido relativizados, de forma que la producción de CIAT 899 adquiere un valor numérico 1 en YM3 e YM10. Los medios YS e YA no adquieren ese valor debido a que son YM3 modificados, luego se comparan con los valores de CIAT 899 en el medio YM3. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas al nivel $\alpha = 5\%$ con respecto a CIAT 899 utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

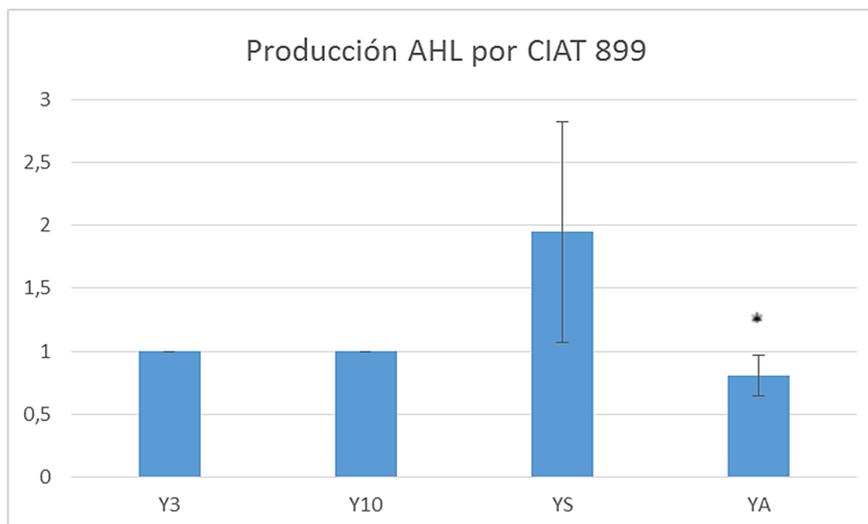


FIGURA 8. Diferencias observadas en la producción de AHL por CIAT 899 en los diferentes medios de cultivo. Los valores de producción han sido relativizados, de forma que la producción de CIAT 899 adquiere un valor numérico 1 en YM3 e YM10. Los medios YS e YA no adquieren ese valor debido a que son YM3 modificados, luego se comparan con los valores de CIAT 899 en el medio YM3. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas al nivel $\alpha = 5\%$ con respecto a la producción en YM3 utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Estos resultados se contraponen con otros estudios llevados a cabo en otras bacterias, como es el caso de la estirpe de *S. fredii* SMH12. Se trata de un rizobio con un amplio rango de nodulación que incluye la soja. En presencia del flavonoide inductor de los genes *nod*, genisteína, se mejora la producción global de AHL, detectándose moléculas como C14-HSL sólo en cultivos bacterianos complementados con genisteína. Además, SMH12 posee al menos un gen *traI*, que es responsable de la síntesis de 3-oxo-C8-HSL, y al menos dos genes de tipo *luxI* no identificados implicados en la síntesis de C8-HSL y C14-HSL (Pérez-Montaña *et al.*, 2011). Cabe destacar que en esta bacteria se observaron cambios en la expresión de *traI* en presencia del flavonoide genisteína, que no se observaron ni en el caso del mutante *nodD1* ni en la cepa de lactonasa, sugiriendo que la inducción de la transcripción tiene lugar a través de NodD1 y que los sistemas QS son necesarios para la mejora de la expresión génica, probablemente debido a la retroalimentación positiva típica de los sistemas QS a alta densidad celular. Por todo ello, los autores sugieren que los flavonoides inductores de genes *nod* mejoran la transcripción de ciertos genes de síntesis de AHL de SMH12 (Pérez-Montaña *et al.*, 2014).

5.3 Construcción de mutantes por delección de los genes *traIA* y *traIB* de CIAT 899 mediante PCR solapante

Hasta la fecha se han conseguido amplificar y purificar los fragmentos 1-2 y 3-4 circundantes a los genes *traIA* y *traIB*, así como la amplificación conjunta de los dos fragmentos en uno sólo (1-4), la digestión de dichos fragmentos 1-4 y su clonación en el plásmido pK18*mob:sacB* (Figura 9). Sin embargo y, a pesar de numerosos intentos, no se ha conseguido la transferencia de dicho plásmido para la posterior delección de los genes *traIA* y *traIB* de CIAT 899.

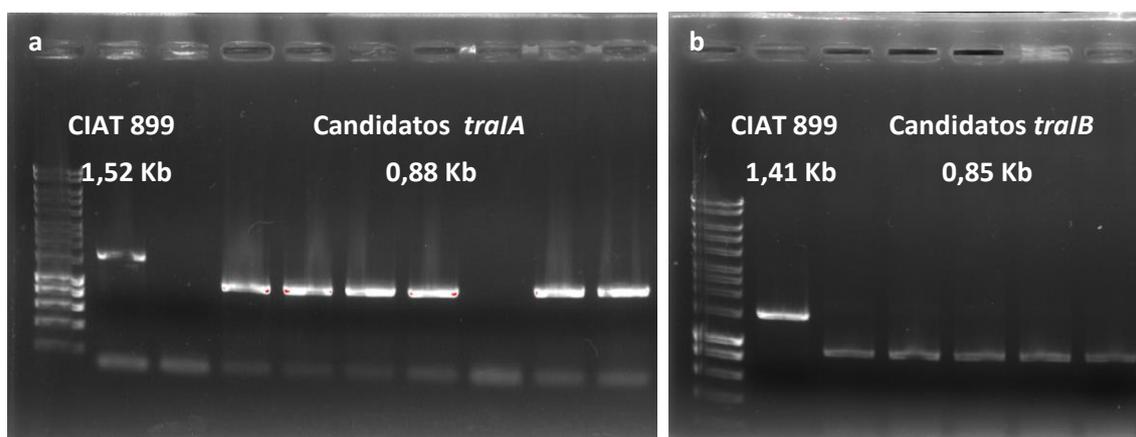


FIGURA 9. Mutantes confirmados para los genes *traIA* (a) y *traIB* (b). Presentan una banda de menor tamaño que la estirpe silvestre (CIAT 899).

5.3.1 Estudio de la producción de AHL de cepas derivadas de CIAT 899 por delección de los plásmidos a y b

Como se citó con anterioridad, el gen *traIB* se localiza en el plásmido simbiótico mientras que *traIA* se localiza en el plásmido a. Es por ello que se ha llevado a cabo el estudio desde otra perspectiva, de forma que se han utilizado bacterias curadas de uno o de los dos plásmidos con el fin de comprobar si esas cepas siguen produciendo AHL. Concretamente, se utilizó la bacteria RSP900, curada para el plásmido simbiótico, y SVQ587, curada tanto para el plásmido simbiótico como para el plásmido a. En primer lugar, se llevaron a cabo amplificaciones de los genes *traIA* y *traIB* en ambas estirpes, utilizando como control CIAT 899. Como se muestra en la Figura 10, RSP900 sólo amplificó *traIA* dado que carece del plásmido simbiótico, mientras que SVQ587 no amplificó ninguno de los genes *traI*. Por tanto, RSP900 debe comportarse como un mutante simple de *traIB*, lo que también permitiría deducir el tipo de molécula AHL que se sintetiza a partir de *traIA*, y la segunda como un doble mutante *traIA/traIB*.

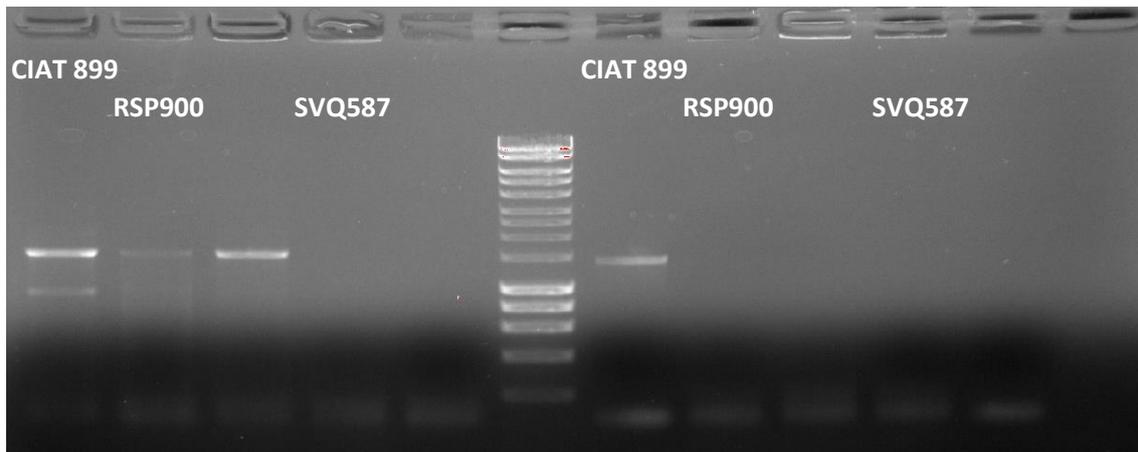


FIGURA 10. Electroforesis en gel de agarosa de las bacterias curadas. A la izquierda del marcador de 1 Kb se muestra la PCR para *traIA*, y a la derecha del marcador de 1 Kb se muestra la PCR para *traIB*, en comparación con el ADN genómico de CIAT 899. La ausencia de bandas en la zona derecha confirma que ninguna de las dos bacterias presenta el plásmido simbiótico, pues *traIB* se encuentra en dicho plásmido. Además, SVQ587 tampoco presenta el plásmido a, pero sí se encuentra en RSP900, debido a que es en ésta última en donde se observan bandas de amplificación para el gen *traIA*, que se encuentra en ese plásmido.

Una vez comprobadas ambas bacterias curadas se procedió a la extracción con diclorometano de las AHL a partir de sobrenadantes de cultivos en YM3 de CIAT 899, RSP900 y de SVQ587, su análisis mediante TLC y su revelado con el biosensor NT1 (pZLR4). Como se muestra en la Figura 11, mientras CIAT 899 parece producir al menos una molécula de tipo AHL, que por su movilidad podría corresponder a la oxo-C8-HSL (molécula que se ha demostrado en varias especies que es la sintetizada por *traI*), RSP900 parece producir la misma AHL pero en menor cantidad, seguramente debido a la ausencia de *traIB*. SVQ587 no parece producir ninguna molécula, lo que estaría justificado por la ausencia de los genes *traIA* y *traIB*. La producción de AHL llevada a cabo por estas bacterias también se comprobó mediante ensayos β -galactosidasa, lo que permitió confirmar los resultados (Figura 12).

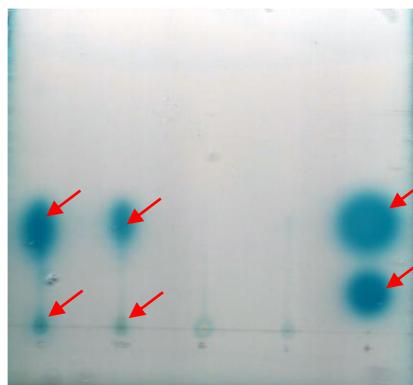


FIGURA 11. TLC en la que se muestra la producción de las moléculas de AHL. De izquierda a derecha: CIAT 899, RSP900, SVQ587, CIAT (pME6863) y control con C8-HSL (abajo) y C6-HSL (arriba).

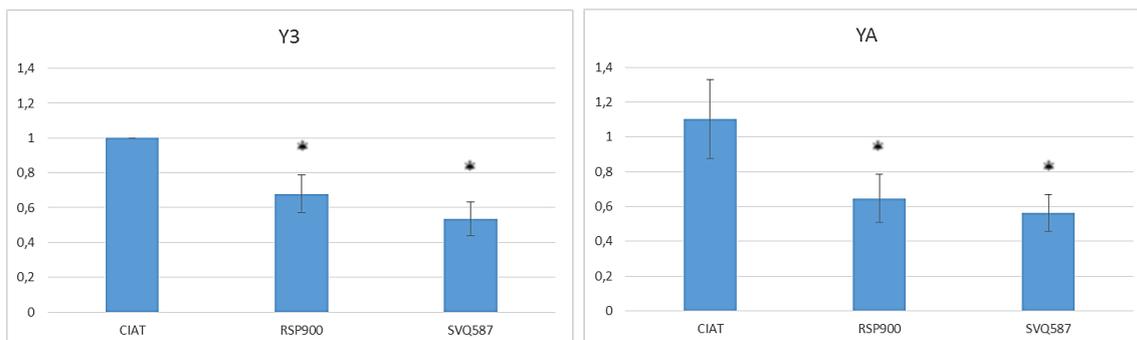


FIGURA 12. Diferencias en la producción de AHL en los distintos medios de cultivo de CIAT 899 y los mutantes RSP900 y SVQ587. Los valores de producción han sido relativizados, de forma que la producción de CIAT 899 adquiere un valor numérico 1 en YM3. El medio YA no adquiere ese valor debido a que se trata de YM3 modificado, luego se compara con los valores de CIAT 899 en el medio YM3. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas al nivel $\alpha = 5\%$ con respecto a CIAT 899 utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

6. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Tras la realización de este trabajo se ha abierto una nueva línea de investigación con respecto a las relaciones simbióticas que presenta *R. tropici* CIAT 899 con sus leguminosas hospedadoras, incluyendo a los genes implicados en dicho proceso, entre ellos los genes *nodD*.

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten obtener las siguientes conclusiones:

1. CIAT 899 portadora del gen de la lactonasa carece de AHL y está afectada en su simbiosis con la judía, provocando un menor número de nódulos y plantas con menor peso seco que la estirpe silvestre. Sin embargo, estas diferencias no se pudieron observar en el caso de las plantas de leucena, al menos tras dos meses de crecimiento. Cada planta lleva a cabo la simbiosis de forma diferente, de hecho la judía forma nódulos determinados y la leucena indeterminados, lo que quiere decir que los efectos de las AHL producidas por CIAT 899 sobre la planta pueden variar.
2. La producción de AHL por CIAT 899 parece ser dependiente del gen *nodD1*, de modo que mutantes en este gen producen significativamente menos cantidad de AHL que la estirpe silvestre en todas las condiciones.
3. El flavonoide apigenina, inductor de los genes de nodulación de CIAT 899, inhibe la producción de AHL de CIAT 899 y este efecto podría ser debido a su interacción con NodD1. De hecho, que en presencia de flavonoides dicha

producción disminuya podría ser debido a la reorientación de su actividad hacia la producción de factores Nod. Por el contrario, la sal provoca un aumento no significativo de la producción.

4. Se ha podido comprobar que CIAT 899 presenta dos genes *traI*, uno localizado en el plásmido a y otro en el plásmido simbiótico. Ambos genes parece que contribuyen a la producción de, al menos, una molécula AHL, que por su movilidad podría corresponder a una oxo-C8-HSL.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Barreto, A. C. (2011) «Quorum Sensing: sistemas de comunicación bacteriana», en *Ciencia Actual*. Universidad de San Buenaventura, Facultad de Ciencias de la Salud, pp. 43-50.
- Brameyer, S., Bode, H. B. y Heermann, R. (2015) «Languages and dialects: Bacterial communication beyond homoserine lactones», *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, 23(9), pp. 521-523.
- Calatrava-Morales, N., McIntosh, M. y Soto, M. (2018) «Regulation mediated by N-acyl homoserine lactone Quorum Sensing signals in the *Rhizobium*-legume symbiosis», *Genes*, 9(5), p. 263.
- Camacho, E. M. y Casadesús, J. (2005) «Regulation of *traJ* transcription in the *Salmonella* virulence plasmid by strand-specific DNA adenine hemimethylation», *Molecular Microbiology*, 57(6), pp. 1700-1718.
- Cao, H. *et al.* (2008) «Complex quorum-sensing regulatory systems regulate bacterial growth and symbiotic nodulation in *Mesorhizobium tianshanense*», *Archives of Microbiology*, 191(3), pp. 283-289.
- Del Cerro, P., Rolla-Santos, A. A. P., Gomes, D. F., Marks, B. B., Espuny, M. del R., *et al.* (2015) «Opening the “black box” of *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899», *BMC Genomics*. BMC Genomics, 16(1), pp. 1-10.
- Del Cerro, P., Rolla-Santos, A. A. P., Gomes, D. F., Marks, B. B., Pérez-Montañó, F., *et al.* (2015) «Regulatory *nodD1* and *nodD2* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 and their roles in the early stages of molecular signaling and host-legume nodulation», *BMC Genomics*, 16(1), pp. 1-13.
- Del Cerro, P. *et al.* (2017) «The *Rhizobium tropici* CIAT 899 NodD2 protein regulates the production of Nod factors under salt stress in a flavonoid-independent manner», *Scientific Reports*, 7(March), pp. 1-10.
- Cha, C. *et al.* (1998) «Production of Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing signals by Gram-Negative plant-associated bacteria», *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(11), pp. 1119-1129.

- D’Haeze, W. y Holsters, M. (2004) «Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity.», *Trends in microbiology*. Elsevier, 12(12), pp. 555-61.
- Daniels, R. *et al.* (2002) «The *cin* Quorum Sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation», *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), pp. 462-468.
- Dénarié, J., Debellé, F. y Promé, J.-C. (1996) «*Rhizobium* Lipo-Chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis», *Annual Review of Biochemistry*, 65(1), pp. 503-535.
- Dessaux, Y. y Faure, D. (2018) «Quorum Sensing and Quorum Quenching in *Agrobacterium*: A “go/no go system”?»», *Genes*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 9(4), p. 210.
- Fauvart, M. y Michiels, J. (2008) «Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis», *FEMS Microbiology Letters*, 285(1), pp. 1-9.
- Ferguson, B. J. *et al.* (2010) «Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation», *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), pp. 61-76.
- Gibson, K. E., Kobayashi, H. y Walker, G. C. (2008) «Molecular determinants of a symbiotic chronic infection», *Annual Review of Genetics*, 42(1), pp. 413-441.
- González, J. E. y Marketon, M. M. (2003) «Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia.», *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 67(4), pp. 574-92.
- González, J. F. y Venturi, V. (2013) «A novel widespread interkingdom signaling circuit», *Trends in Plant Science*, 18(3), pp. 167-174.
- Guasch-Vidal, B. *et al.* (2013) «High NaCl concentrations induce the *nod* genes of *Rhizobium tropici* CIAT899 in the absence of flavonoid inducers», *Molecular Plant-Microbe Interactions*. The American Phytopathological Society, 26(4), pp. 451-460.
- Jiménez Guerrero, I. (2015) «Implicación del sistema de secreción de tipo 3 de *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103 en la modulación de la respuesta de defensa de *Glycine max* cv. Williams y estudio de los efectores específicos secretados a través de este sistema» Tesis Doctoral. Sevilla

- Liu, C.-W. y Murray, J. (2016) «The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: an update», *Plants*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 5(3), p. 33.
- Long, S. R. (1996) «*Rhizobium* symbiosis: Nod factors in perspective.», *The Plant cell*. American Society of Plant Biologists, 8(10), pp. 1885-98.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Nueva York (EEUU): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Martinez, E. *et al.* (1985) «Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*», *Journal of General Microbiology*, 131(7), pp. 1779-1786.
- Masson-Boivin, C. *et al.* (2009) «Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: How many *Rhizobium* recipes?», *Trends in Microbiology*, 17(10), pp. 458-466.
- Mathesius, U. *et al.* (2003) «Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial Quorum-Sensing signals», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(3), pp. 1444-1449.
- Miller, J. H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Oldroyd, G. E. D. *et al.* (2011) «The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis», *Annual Review of Genetics*, 45(1), pp. 119-144.
- Oldroyd, G. E. D. (2013) «Speak, friend and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants», *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), pp. 252-263.
- Ormeño-Orrillo, E. *et al.* (2012) «Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium sp.* PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)», *BMC Genomics*, 13(1), pp. 1-26.
- Peck, M. C., Fisher, R. F. y Long, S. R. (2006) «Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to *nod* gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*.», *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology, 188(15), pp. 5417-27.
- Pérez-Montaño, F. *et al.* (2011) «Nodulation-gene-inducing flavonoids increase overall

- production of autoinducers and expression of N-acyl homoserine lactone synthesis genes in rhizobia», *Research in Microbiology*, 162(7), pp. 715-723.
- Pérez-Montaño, F. *et al.* (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*. Editado por R. M. Roop, 9(8), p. e105901.
- Pérez-Montaño, F. *et al.* (2016) «RNA-seq analysis of the *Rhizobium tropici* CIAT 899 transcriptome shows similarities in the activation patterns of symbiotic genes in the presence of apigenin and salt», *BMC Genomics*. BMC Genomics, 17(1), pp. 1-11.
- Perret, X., Staehelin, C. y Broughton, W. J. (2000) «Molecular basis of symbiotic promiscuity.», *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. American Society for Microbiology, 64(1), pp. 180-201.
- Rosemeyer, V. *et al.* (1998) «*luxI*- and *luxR*- homologous genes of *Rhizobium etli* CNPAF512 contribute to synthesis of autoinducer molecules and nodulation of *Phaseolus vulgaris*.», *Journal of bacteriology*, 180(4), pp. 815-21.
- 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, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schäfer, A. *et al.* (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*. Elsevier, 145(1), pp. 69-73.
- Vargas, C. *et al.* (1990) «Identification and cloning of nodulation genes and host specificity determinants of the broad host-range *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli strain CIAT899.», *Molecular microbiology*, 4(11), pp. 1899-910.
- Vincent, J. M. (1970) *A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria*. Oxford: Oxford-Edinburgh 1970: Blackwell Scientific Publication.

- Wasson, A. P., Pellerone, F. I. y Mathesius, U. (2006) «Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia.», *The Plant cell*. American Society of Plant Biologists, 18(7), pp. 1617-29.
- Waters, C. M. y Bassler, B. L. (2005) «Quorum Sensing: cell-to-cell communication in bacteria», *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), pp. 319-346.
- Whiteley, M., Diggle, S. P. y Greenberg, E. P. (2017) «Progress in and promise of bacterial Quorum Sensing research», *Nature*. Nature Publishing Group, 551(7680), pp. 313-320.
- Zarkani, A. *et al.* (2013) «Homoserine lactones influence the reaction of plants to rhizobia», *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 14(8), pp. 17122-17146.

8.1 Bibliografía de la portada y el índice no nombradas anteriormente

Portada:

Estrada, G. *et al.* (sin fecha) *La transformación genética y genómica del frijol*.

Índice:

Gschmeissner, S. (2013) *Nitrogen-fixing Bacteria, Sem* [fotografía]. Science photo Library