Departamento de Microbiología

Facultad de Biología

Caracterización de rizobios aislados de leguminosas del suroeste de Andalucía e implicación del gen *nolG* en la simbiosis *Ensifer meliloti* ORT12 - *Medicago sativa*

Cynthia Alías Villegas

Sevilla, 2016

Departamento de Microbiología

Facultad de Biología

Caracterización de rizobios aislados de leguminosas del suroeste de Andalucía e implicación del gen *nolG* en la simbiosis *Ensifer meliloti* ORT12 - *Medicago sativa*

Memoria presentada por la licenciada en Biología Cynthia Alías Villegas para optar al grado de Doctor

Sevilla, 2016

Departamento de Microbiología

Facultad de Biología

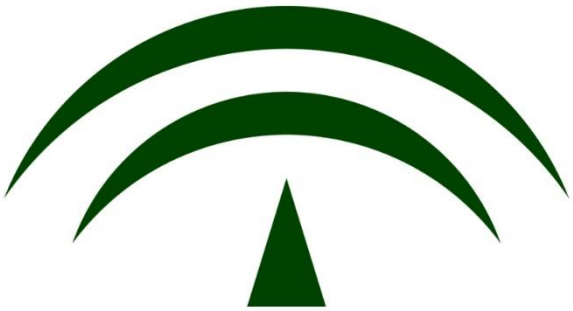
LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Fdo. Dra. Mª Rosario Espuny Gómez
Catedrática
Departamento de Microbiología
Universidad de Sevilla

Fdo. Dra. María Camacho Martínez-Vara de Rey
Investigador Titular
IFAPA Centro Las Torres-Tomejil

Fdo. Dr. Francisco Temprano Vera
Investigador Titular
IFAPA Centro Las Torres-Tomejil

Fdo. Cynthia Alías Villegas



Mi agradecimiento a la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía y a la Universidad de Sevilla por haber hecho posible la realización de este trabajo

"Lo importante de un primer paso no es la distancia recorrida, sino la dirección"

Martin Luther King

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Director de Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla, Fco. Javier Ollero Márquez por permitirme realizar este trabajo en el Departamento.

A mis directores de Tesis, Charo Espuny, María Camacho y Paco Temprano, por todo lo que me han enseñado y ayudado en este tiempo, por su dedicación y empeño en este proyecto, Gracias.

Gracias a todos los miembros de Departamento, por la ayuda que en muchos momentos, de una u otra manera, me han prestado.

ÍNDICES

Índice

Introducción

1. Los rizobios 1

2. El Proceso simbiótico rizobio-leguminosa 1

3. Características de los rizobios 6

3.1 Genes simbióticos 7

3.2 Superficie celular 7

3.3 Quorum sensing (QS) 10

3.4 Movilidad 11

3.5 Sistemas de secreción 12

3.6 Estructura, biosíntesis y secreción de los factores Nod 14

3.7 Regulación de la producción de factores Nod en *E. meliloti* 17

4. Taxonomía de los rizobios 18

5. Simbiovariedades 19

5.1 Simbiovariedades del género *Ensifer* 20

6. Tipos de estrés que afectan a la simbiosis 22

6.1 Estrés salino 22

6.2 Estrés por pH 24

6.3 Estrés por metales 25

7. Sistemas de incorporación de metales a bacterias 27

7.1 Transportadores TBDT 28

7.2 Transportadores ABC 28

7.3 Permeasas de alta afinidad 28

8. Sistemas de resistencia a metales en bacterias 29

8.1 ATPasa de tipo P_{IB} 30

8.2 Familia de proteínas facilitadoras de la difusión de cationes (CDF) 31

8.3 Familia de proteínas RND 32

8.3.1 El operón nodM-nolFG-nodN 35

9. Lugares de estudio: Paraje Natural Marismas del Odiel y Paisaje Protegido de Río Tinto 37

9.1 Paraje Natural Marismas del Odiel 37

9.2 Paisaje Protegido de Río Tinto 38

9.3 Plantas leguminosas presentes en las Marismas del Odiel y en Río Tinto. *Medicago marina* 38

Objetivos

Objetivos..... 43

Materiales y métodos

1. Materiales y Métodos relacionados con bacterias 47
1. 1 Bacterias, plásmidos y agentes selectivos e identificativos 47
1. 1. 1 Bacterias y plásmidos 47
1. 1. 2 Agentes selectivos e identificativos 52
1. 1. 3 Flavonoides 52
1. 2 Medidas de pH, espectrofotometría y solución de congelación para bacterias 53
1. 3 Medios de cultivo 53
1. 3. 1 Medios de cultivo para los rozobios 53
1. 3. 2 Medios de cultivo para *Escherichia coli* 56
1. 4 Métodos relacionados con los ácidos nucleicos 57
1. 4. 1 Métodos de transferencia de ADN 57
1. 4. 2 Extracción del ADN genómico 59
1. 4. 3 Extracción del ADN plasmídico 60
1.4.4 Extracción de ARN de *E. meliloti* 61
1. 4. 5 Restricción del ADN 62
1. 4. 6 Electroforesis del ADN 62
1. 4. 7 Aislamiento del ADN de geles de agarosa 63
1. 4. 8 Conversión de extremos cohesivos en romos 63
1. 4. 9 Ligación del ADN 63
1. 4. 10 Amplificación del ADN por PCR 63
1.4.11 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) 66
1. 4. 12 Mutagénesis *in vitro* por deleción mediante PCR solapante 66
1. 4. 13 Hibridación ADN:ADN, (Southern blot) 68
1. 4. 14 Secuenciación del ADN 70
1. 4. 15 Análisis informático de secuencias de ADN y construcción de árboles filogenéticos 70
1.4.16 RT- *q*PCR (Reverse transcription quantitative real-time PCR) 71
1. 5 Métodos utilizados en el estudio de las bacterias 72

1.5.1 Medida de la actividad β-galactosidasa....72
1.5.2 Estudio de los lipopolisacáridos (LPS)....73
1.5.3 Producción de Ácido Indol Acético (AIA)....75
1.5.4. Solubilización de fosfatos....75
1.5.5 Obtención de autoinductores (AI) de los sobrenadantes de cultivos bacterianos....76
1.5.6 Ensayos de detección de AI....76
1.5.7 Tolerancia a metales pesados de las bacterias aisladas....76
1.5.8 Electroforesis de plásmidos de alto peso molecular....77
1.5.9 Curvas de crecimiento....77
1.5.10 Ensayos de movilidad de tipo *swimming*....78
2. Materiales y métodos utilizados para los estudios con plantas....78
2. 1 Plantas....78
2.2 Aislamientos de las bacterias de los nódulos....79
2. 3 Soluciones nutritivas para las plantas....79
2. 4 Desinfección y germinación de semillas....80
2. 5 Ensayos de eficiencia....80
2.6 Ensayos de competitividad mediante detección del plásmido pGUS3, en plantas de alfalfa....81
2.7 Ensayos de cinética de nodulación en plantas de alfalfa....82
2.8 Ensayos de adhesión-colonización en plantas de alfalfa....82

Resultados (Capítulo 1)

1. Análisis físico-químico de los suelos de las áreas seleccionadas....91
2. Aislamiento y determinación de los rizobios....100
2.1 Selección de bacterias aisladas de nódulos de leguminosas de las áreas de las Marismas del Odiel y del paraje del Río Tinto en base a su perfil de ERIC-PCR....100
2.2 Amplificación del gen *nodC*....104
2.3 Caracterización simbiótica....104
3. Rango de crecimiento con NaCl....107
4. Rango de crecimiento a distintos pH....108
5. Produccion de acil homoserina lactonas (AHL)....110
6. Propiedades promotoras del crecimiento vegetal....111
6.1 Producción de ácido indol-acético (AIA) y solubilización de fosfatos....111

Resultados (Capítulo 2)

1. Aislamiento de rizobios de los nódulos de *M. marina* 116

1.1 Selección de bacterias aisladas de nódulos en base a su perfil de ERIC-PCR 116

2. Identificación de los aislamientos de *M. marina* a nivel de especie mediante análisis genético 116

2.1 Secuencia del gen ARNr 16S 116

2.2 Perfil RFLP de la región intergénica IGS 118

2.3 Secuencia del gen *glnII* 119

3. Perfil de plásmidos 121

4. Perfil de lipopolisacáridos (LPS) 122

5. Caracterización fisiológica 123

5.1 Rango de crecimiento con NaCl 123

5.2 Rango de crecimiento a distintos pH 124

5.3 Rango de crecimiento a distintas temperaturas 124

5.4 Asimilación de diferentes fuentes de carbono 124

5.5 Resistencia frente a diferentes antibióticos 125

6. Rango de hospedador 128

7. Nodulación en plantas de *M. marina* 129

8. Análisis filogenético de los genes simbióticos *nodC* y *nodA* 130

Resultados (Capítulo 3)

1. Metales pesados presentes en las zonas de estudio 136

2. Resistencia a metales pesados de los aislamientos de nódulos de leguminosas de las áreas de estudio 137

3. Búsqueda de genes de resistencia a metales pesados 139

3.1 Gen SMc04128 de *E. meliloti* 1021 que codifica una ATPasa de tipo P_{IB} con alta similitud al gen *cadA* 139

3.2 Gen *nolG* 141

3.2.1 Secuenciación del gen *nolG* en las estirpes de *E. meliloti* ORT12 y *E. medicae* SF3.41 142

4. Construcción de un mutante en el gen *nolG* de *E. meliloti* ORT12 y de *E. medicae* SF3.41 .. 145

5. Caracterización de los mutantes en el gen *nolG* de *E. meliloti* SVQ747 y *E. medicae* SVQ748 por la inserción del casete *lacZ*-Gm 148

5.1Respuesta a metales pesados 148

5.1.1 Tolerancia a los metales pesados 148

5.1.2 Curva de crecimiento en presencia de metales pesados.....149
5.2 Movilidad tipo *swimming* 152
5.3 Fenotipo en respuesta a flavonoides 155
5.3.1 Estudio de la capacidad de inducción por flavonoides de los genes de nodulación mediante la actividad β-galactosidasa 155
5.3.2 Curvas de crecimiento en presencia de luteolina 158
5.3.3 Movilidad de tipo *swimming* en presencia de luteolina.....161
5.4 Fenotipo simbiótico.....162
5.4.1 Ensayos de competitividad en *M. sativa* 162
5.4.2 Ensayos de cinética de nodulación en *M. sativa*.....165
5.4.3 Ensayos de eficiencia de SVQ747 y sus derivados en *M. sativa*.....167
5.4.4. Estudios de adhesión- colonización a las raíces de alfalfa por *E. meliloti* SVQ747 y su derivado SVQ749.....167
6 Expresión génica 168
6.1 Estudio de la inducción por luteolina del gen *nodA* de *E. meliloti* SVQ747 mediante *q*PCR 168
6.2 Estudio de la inducción por luteolina en el gen *nodA* de *E. meliloti* SVQ749 mediante *q*PCR 169
6.3 Estudio de la expresión de los genes *nolG y nodN* en presencia de luteolina mediante *q*PCR 169
7. Posible efecto polar sobre el gen *nodN* de la mutación por inserción en el gen *nolG* en SVQ749.....171
7.1 Construcción de un mutante delecionado en el gen *nolG* de la estirpe SVQ747 171
8. Caracterización del mutante por deleción del gen *nolG* en la estirpe SVQ747 de *E. meliloti* 174
8.1 Fenotipo en respuesta a metales pesados 174
8.1.1 Tolerancia a metales pesados 174
8.1.2 Curvas de crecimiento en presencia de metales pesados 175
8.2 Fenotipo en movilidad de tipo *swimming* del mutante SVQ761 176
8.3 Fenotipo simbiótico.....178
8.3.1 Ensayos de eficiencia del mutante SVQ761 178
8.3.2 Ensayos de competitividad por la nodulación en *M. sativa* del mutante por deleción del gen *nolG*.....178
8.3.3 Ensayos de cinética de nodulación de la alfalfa 180
8.3.4 Estudios de adhesión - colonización a las raíces de alfalfa por E. meliloti SVQ747 y su derivado mutado en el gen nolG, SVQ761 182

9. Expresión del promotor del gen *nodC* en presencia de luteolina.....183

Discusión

Discusion…….. 187

Conclusiones

Conclusiones…….. 213

Bibliografía

Bibliografía…….. 217

Índice de Figuras

Figura 1. Estrategias de nodulación en los rizobios……3

Figura 2. Proceso de desarrollo del nódulo a través de la vía dependiente de factores Nod……4

Figura 3. Desarrollo nodular……5

Figura 4. Esquema de la superficie celular de los rizobios……10

Figura 5. Tipos de movilidades bacterianas……12

Figura 6. Movilidad tipo *surfing*……12

Figura 7. Estructura de los factores Nod……15

Figura 8. Estructura del LCO producido por *E. fredii* USDA 191……16

Figura 9. Sistemas de entrada de metal en bacterias……27

Figura 10. Principales sistemas de salida de cationes metálicos en bacterias Gram negativas…30

Figura 11. Mecanismo y función celular de las proteínas RND……33

Figura 12. Esquema de la mutagénesis *in vitro* por deleción mediante PCR solapante……67

Figura 13. Mapa del Parque Natural Marismas del Odiel……89

Figura 14. Vista aérea de la zona 2 y zona aproximada de los puntos de muestreo……89

Figura 15. Imágenes de las zonas "Recuperada" y "No recuperada"…… 90

Figura 16. Perfiles ERIC……101

Figura 17. Perfiles ERIC……101

Figura 18. Perfiles ERIC……102

Figura 19. Árbol filogenético donde se aprecia la relación entre las secuencias del gen ARNr 16S de cada aislamiento con las de las cepas tipo de *E. meliloti* y *E. medicae*……117

Figura 20. Perfiles RFLP de la región IGS digeridos con los enzimas *Alu*I y *Msp*I……118

Figura 21. Árbol filogenético donde se aprecia la relación entre las secuencias del gen *glnII* de una serie de aislamientos seleccionados con la de las cepas tipo de *E. meliloti* y *E. medicae*….120

Figura 22. Árbol filogenético donde se aprecia la relación entre las secuencias del gen *nodC* de una serie de aislamientos seleccionados con diferentes cepas de *E. meliloti* ……131

Figura 23. Árbol filogenético donde se aprecia la relación entre las secuencias del gen *nodA* de una serie de aislamientos seleccionados con diferentes cepas de *E. meliloti*……132

Figura 24. Amplificación por PCR de un fragmento de aproximadamente 2,5 kb correspondiente al gen *nolG*……142

Figura 25. Alineamiento de los fragmentos en los que se han encontrado cambios de la secuencia de nucleótidos del gen *nolG* de *E. meliloti* ORT12 con la correspondiente secuencia homóloga de *E. meliloti* 1021…… 143

Figura 26. Alineamiento de los fragmentos en los que se han encontrado cambios de la secuencia de nucleótidos del gen *nolG* de *E. medicae* SF3.41 con la correspondiente secuencia homóloga de *E. medicae* WSM419…… 144

Figura 27. Alineamiento de los fragmentos en los que se han encontrado cambios de la secuencia de aminoácidos de la proteína NolG de *E. meliloti* ORT12 con la correspondiente proteína homóloga de *E. meliloti* 1021……144

Figura 28. Construcción de los mutantes SVQ749 y SVQ750 por en inserción del casete *lacZ*-Gm en el gen *nolG* de *E. meliloti* SVQ747 y *E. medicae* SVQ748 respectivamente……146

Figura 29. Hibridación en Southern para comprobar los mutantes en el gen *nolG* por inserción del casete *lacZ*-Gm……..147

Figura 30. Construcción del plásmido pMUS1306 por clonación de un fragmento de 3257 pb correspondientes al gen *nolG* completo de *E. meliloti* SVQ747, en el plásmido pBBR1MCS-2.147

Figura 31. Construcción del plásmido pMUS1313 por clonación de un fragmento de 3257 pb correspondientes al gen *nolG* completo de *E. medicae* SVQ748, en el plásmido pBBR1MCS-2..148

Figura 32. Halos de inhibición del crecimiento formados por metales pesados en la estirpe …149

Figura 33. Curva de crecimiento de las estirpes SVQ747, SVQ749 y SVQ749 pMUS1306 de *E. meliloti*, en medio TY suplementado con $CdCl_2$ a una concentración de 0,2 mM……150

Figura 34. Curva de crecimiento de las estirpes SVQ747, SVQ749 y SVQ749 pMUS1306 de *E. meliloti*, en medio TY suplementado con $ZnSO_4$ a una concentración de 0,56 mM……..151

Figura 35. Curva de crecimiento de las cepas SVQ748, SVQ750 y SVQ750 pMUS1313 de *E. medicae*, en medio TY suplementado con $CdCl_2$ a una concentración de 0,075 mM……151

Figura 36. Curva de crecimiento de las cepas SVQ748, SVQ750 y SVQ750 pMUS1313 de *E. medicae*, en medio TY suplementado con $ZnSO_4$ a una concentración de 0,27 mM……152

Figura 37. Curva de crecimiento en medio Bromfield de la estirpe parental *E. meliloti* SVQ747 y la cepa mutante SVQ749……153

Figura 38. Movilidad tipo *swimming* en medio Bromfield 0,3% de agar, medida según el diámetro en mm del halo de movilidad del parental *E. meliloti* SVQ747 y su derivado mutante en el gen *nolG*, SVQ749…… 154

Figura 39. Movilidad tipo *swimming* en medio Bromfield 0,3% de agar y kanamicina 60 µg ml^{-1}, medida según el diámetro en mm del halo de movilidad de las estirpes *E. meliloti* SVQ749 pBBR1MCS-2 y SVQ749 pMUS1306……..154

Figura 40. Curva de crecimiento en medio Bromfield de la estirpe parental *E. medicae* SVQ748 y la cepa mutante SVQ750……154

Figura 41. Movilidad tipo *swimming* en medio Bromfield 0,3% de agar, medida según el diámetro en mm del halo de movilidad del parental *E. medicae* SVQ748 y su derivado mutante en el gen *nolG*, SVQ750……..155

Figura 42. Movilidad tipo *swimming* en medio Bromfield 0,3% de agar y kanamicina 30 µg ml^{-1}, medida según el diámetro en mm del halo de movilidad de las estirpes *E. medicae* SVQ750 pBBR1MCS-2 y SVQ750 pMUS1313……..155

Figura 43. Curva de crecimiento en medio TY de *E. meliloti* SVQ747 y sus derivados SVQ749 y SVQ749 pMUS1306…… 159

Figura 44. Curva de crecimiento en medio TY suplementado con luteolina (1 µg ml^{-1}) de *E. meliloti* SVQ747 y sus derivados SVQ749 y SVQ749 pMUS1306……159

Figura 45. Curva de crecimiento en medio TY de *E. medicae* SVQ748 y sus derivados SVQ750 y SVQ750 pMUS1313…… 160

Figura 46. Curva de crecimiento en medio TY suplementado con luteolina (1 µg ml^{-1}) de *E. medicae* SVQ748 y sus derivados SVQ750 y SVQ750 pMUS1313……..160

Figura 47. Movilidad tipo *swimming* en presencia de luteolina (1 µg ml^{-1}), de la estirpe *E. meliloti* SVQ747 y su mutante SVQ749……..161

Figura 48. Movilidad tipo *swimming* en presencia de luteolina (1 µg ml^{-1}), de la estirpe *E. medicae*SVQ787 y su derivado mutante SVQ750……..162

Figura 49. Ensayo de competitividad de SVQ747 y sus derivados frente a la estirpe SVQ747 pGUS3……..164

Figura 50. Número de nódulos por planta de *M. sativa* inoculadas con *E. meliloti* SVQ747 y su derivado SVQ749……..165

Figura 51. Número de nódulos por planta de *M. sativa* inoculadas con *E. meliloti* SVQ747 y sus derivados SVQ749, SVQ749 pBBR1MCS-2 y SVQ749 pMUS1306……166

Figura 52. Expresión relativa del gen *nodA* mediante qPCR en la estirpe *E. meliloti* SVQ747 en presencia y ausencia de luteolina (1 µg ml^{-1})……..168

Figura 53. Expresión relativa del gen *nodA* en presencia y ausencia de luteolina (1 µg ml^{-1}) en las estirpes SVQ747 y SVQ749……169

Figura 54. Expresión relativa del gen *nolG* en la estirpe SVQ747 en presencia de luteolina……170

Figura 55. Expresión relativa del gen *nodN* en la estirpe SVQ747 en presencia de luteolina (1 µg ml^{-1})……170

Figura 56. Expresión relativa del gen *nodN* en las estirpes SVQ747 y SVQ749 en presencia de luteolina (1 µg ml^{-1})……..171

Figura 57. Construcción del plásmido pMUS1326 mediante PCR solapante para la obtención del mutante por deleción en *nolG* en *E. meliloti* SVQ747……..173
Figura 58. Hibridación Southern para la comprobación del mutante por deleción del gen *nolG*, SVQ761……174
Figura 59. Curva de crecimiento de SVQ747 y sus derivados SVQ761 y SVQ761 pMUS1306 en medio TY suplementado con $CdCl_2$ 0,2 mM……175
Figura 60. Curva de crecimiento de SVQ747 y sus derivados SVQ761 y SVQ761 pMUS1306 en medio TY suplementado con $ZnSO_4$ 0,56mM……176
Figura 61. Curva de crecimiento en medio Bromfield de la estirpe parental SVQ747 y el mutante SVQ761……..177
Figura 62. Movilidad de tipo *swimming*, en medio Bromfield 0,3% de agar, medida según el diámetro en mm del halo de movilidad, en la estirpe parental SVQ747 y su mutante delecionado SVQ761……177
Figura 63. Movilidad de tipo *swimming*, en medio Bromfield 0,3% de agar y kanamicina 60 µg ml^{-1}, medida según el diámetro en mm del halo de movilidad, en las estirpes SVQ761 pBBr1MCS-2 y SVQ761 pMUS1306……..177
Figura 64. Ensayo de competitividad de SVQ747 y sus derivados frente a la estirpe SVQ747 pGUS3……..179
Figura 65. Número de nódulos por planta de *M. sativa* inoculadas con *E. meliloti* SVQ747 y sus derivados SVQ749 y SVQ761……180
Figura 66. Número de nódulos por planta de *M. sativa* inoculadas con *E. meliloti* SVQ747 y sus derivados SVQ761, SVQ761 pBBR1MCS-2 y SVQ761 pMUS1306……181
Figura 67. Actividad β-galatosidasa, expresada en Unidades Miller, de SVQ747, SVQ749 y SVQ761 con el plásmido pRmM57 en presencia y ausencia de luteolina (1 µg ml^{-1})……184

Índice de Tablas

Tabla 1. Bacterias y plásmidos utilizados en esta Tesis……47

Tabla 2. Cebadores utilizados en esta Tesis para amplificar fragmentos de ADN o para secuenciación……64

Tabla 3. Cebadores utilizados en esta Tesis para amplificar fragmentos de ADN para la mutagénesis *in vitro* por deleción mediante PCR solapante……66

Tabla 4. Cebadores empleados en RT-*q*PCR……72

Tabla 5. Plantas utilizadas en esta Tesis……78

Tabla 6. Conductividad y acidez de los suelos analizados……91

Tabla 7. Textura de los suelos analizados……91

Tabla 8. Estudio de los parámetros de los suelos……94

Tabla 9. Contenido en metales pesados y otros elementos de las zonas de estudio……95

Tabla 10. Criterios y estándares aplicados en Andalucía……98

Tabla 11. Comparación entre las zonas "Recuperada" y "No recuperada" de las Marismas del Odiel……99

Tabla 12. Relación de aislamientos de nódulos de leguminosas de distintas zonas de las Marismas del Odiel y Río Tinto objeto de estudio……102

Tabla 13. Capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno de los aislamientos en su planta de origen o similar……104

Tabla 14. Capacidad de crecimiento de los aislamientos con 300 y 450 mM de NaCl……107

Tabla 15. Capacidad de crecimiento de los aislamientos a diferentes valores de pH……109

Tabla 16. Producción de AIA y capacidad solubilizadora de fosfatos……111

Tabla 17. Grupos genéticos y perfiles RFLP de los aislamientos de *M. marina*……120

Tabla 18. Número de plásmidos y perfiles LPS de los aislamientos de *M. marina*……122

Tabla 19. Características fisiológicas y capacidad de crecimiento en condiciones de estrés abiótico……126

Tabla 20. Nodulación y fijación de nitrógeno de los aislamientos de *M. marina* y las cepas de referencia en plantas de *M. sativa*, *M. polymorpha*, *M. truncatula*, *M. murex*, *M. orbicularis*, *M. minima* y *M. marina*……128

Tabla 21. Nivel de contaminación por metales pesados de los suelos de las zonas de estudio en Marismas del Odiel, Río Tinto y San Fernando……137

Tabla 22. Niveles máximos de resistencia a metales pesados de una selección de aislamientos de las zonas de las Marismas del Odiel y Río Tinto (ORT), de las dunas de San Fernando (SF) y de las cepas de referencia de *E. meliloti* y *E. medicae*……..138
Tabla 23. Resistencia a cadmio y cinc de los aislamientos de *M. marina*……..140
Tabla 24. Medida en milímetros del diámetro del halo de inhibición formado por diferentes concentraciones en metales pesados en las estirpes de *E.meliloti* SVQ747 y *E. medicae* SVQ748 y sus correspondientes mutantes por inserción del casete *lacZ*-Gm, SVQ749 y SVQ750……..149
Tabla 25. Actividad β-galactosidasa, Unidades Miller de inducción del promotor del gen *nodA* en la estirpe SVQ747 con diferentes flavonoides y número de veces de inducción respecto del control sin flavonoides……156
Tabla 26. Actividad β-galactosidasa, Unidades Miller de inducción del promotor del gen *nodA* en las estirpes parentales SVQ747 y SVQ 748 en comparación con la inducción del gen *lacZ* insertado en el gen *nolG* en las estirpes mutantes SVQ749 y SVQ750……157
Tabla 27. Porcentaje de competitividad de la estirpe silvestre *E. medicae* SVQ748 y su derivado mutante en el gen *nolG*, SVQ750, frente a la cepa SVQ748 pGUS3……..163
Tabla 28. Porcentaje de competitividad de la estirpe SVQ747, el mutante SVQ749 y sus derivados portadores de los plásmidos pBBR1MCS-2 y pMUS1306……..163
Tabla 29. Número de nódulos por planta de *M. sativa* formados por las estirpes SVQ747 y SVQ749 pasados 10 y 17 días de la inoculación……..165
Tabla 30. Número de nódulos por planta de *M. sativa* formados por las estirpes SVQ747 y SVQ749, SVQ749 pBBR1MCS-2 y SVQ749 pMUS1306 pasados 10 días de la inoculación……166
Tabla 31. Número de nódulos por planta de *M. sativa* formados por las estirpes SVQ747 y SVQ749, SVQ749 pBBR1MCS-2 y SVQ749 pMUS1306 pasados 17 días de la inoculación……167
Tabla 32. Eficiencia, peso seco de la parte aérea, número de nódulos y peso seco de los nódulos de la estirpe *E. meliloti* SVQ747 y sus derivados……167
Tabla 33. Número de bacterias por gramo de peso fresco de raíz. Resultados obtenidos rompiendo mecánicamente las raíces para separar las bacterias adheridas……..168
Tabla 34. Medida en milímetros del diámetro del halo de inhibición formado por diferentes concentraciones en metales pesados en la estirpe *E. meliloti* SVQ747 y su correspondiente mutante en el gen *nolG* por delceión SVQ761……175
Tabla 35. Eficiencia, peso seco de la parte aérea, número de nódulos y peso seco de los nódulos de la estirpe *E. meliloti* SVQ747 y sus derivados……178
Tabla 36. Porcentaje de competitividad frente a la cepa parental SVQ747……180

Tabla 37. Número de nódulos por planta de *M. sativa* formados por las estirpes SVQ747 y SVQ749 pasados 10 y 17 días de la inoculación……181

Tabla 38. Número de nódulos por planta de *M. sativa* formados por las estirpes SVQ747 y SVQ761, SVQ761 pBBR1MCS-2 y SVQ761 pMUS1306 pasados 10 días de la inoculación……182

Tabla 39. Número de nódulos por planta de *M. sativa* formados por las estirpes SVQ747 y SVQ761, SVQ761 pBBR1MCS-2 y SVQ761 pMUS1306 pasados 17 días de la inoculación……182

Tabla 40. Número de bacterias por gramo de peso fresco de raíz. Resultados obtenidos rompiendo mecánicamente las raíces para separar las bacterias adheridas……..182

Tabla 41. Número de bacterias por gramo de peso fresco de raíz. Resultados obtenidos sonicando las raíces para separar las bacterias adheridas……..183

ABREVIATURAS

ABC, del inglés ATP Binding Cassette

AHL, N-acil homoserina lactona

AI, autoinductores (del inglés autoinducers)

d.p.i., días tras la inoculación

EPS, exopolisacáridos (del inglés exopolysaccharides)

HAE transportadores de compuestos hidrófobos y anfipáticos (del inglés hydrophobe amphiphile efflux)

HME, transportadores de metales pesados (del inglés heavy metal efflux)

ISR, resistencia sistémica inducida (del inglés, induced systemic resistance)

KPS, polisacáridos capsulares tipo antígeno-K (del inglés, K-capsular polysaccharides)

LCO, lipo-quito-oligosacárido (del inglés, lipochitooligo- saccharide)

LPS, lipopolisacárido (del inglés, lipopolysaccharides)

MATE, del inglés multidrug and toxic compound extrusion

MDR, bomba de resistencia a multidrodas (del inglés multidrug resistance)

MFP, proteína de fusión de membrana (del inglés membrane fusión protein)

MFS, del inglés major facilitator superfamily

N-MBD, dominios de unión a metales localizados en la región amino terminal (del inglés metal binding domain)

Nod, nodulación (del inglés, nodulation)

OMF, proteína de membrana externa (del inglés outer membrane factor)

PGPR, rizobacterias que promueven el crecimiento vegetal (del inglés, plant growth promoting rhizobacteria)

QS, *quorum sensing*

SMR, del inglés small multidrug resistance

RFLP, polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción(del inglés restriction fragment length polymorphism)

RND, bombas implicadas en resistencia, nodulacion y división celular, (del inglés resistance, nodulation and cell división)

ROS, especies reactivas de oxígeno (del inglés, reactive oxigen species)

TBDT, transportadores dependientes de TonB, (del inglés TonB dependent transporter)

TM, dominios transmembrana (del inglés transmembrane domain)

T3SS, sistema de secreción de tipo III (del inglés, type 3 secretion system)

T4SS, sistema de secreción de tipo IV (del inglés, type 4 secretion system)

T6SS, sistema de secreción de tipo VI (del inglés, type 6 secretion system)

INTRODUCCIÓN

1. Los rizobios

Varias especies de bacterias, la mayoría pertenecientes a la clase Alphaproteobacteria y al orden *Rhizobiales* (Madigan *et al*., 2015) pueden establecer una relación simbiótica con plantas de la familia *Leguminosae* (Spaink *et al*., 1998). En su conjunto, a estas bacterias se les denomina rizobios y tienen la capacidad única de inducir la formación de unas estructuras, denominadas nódulos, en las raíces o tallos de las plantas hospedadoras, en los cuales se produce la fijación simbiótica de nitrógeno molecular (N_2). Este proceso se desarrolla a través del intercambio de señales moleculares específicas, como son los flavonoides secretados por las raíces de las leguminosas y los llamados factores Nod producidos por los rizobios tras la percepción de estos flavonoides (Lerouge *et al*., 1990; Spaink *et al*., 1991; Truchet *et al*., 1991).

Dentro de las Alphaproteobacterias, el orden Rhizobiales es el más amplio y en él se encuadran los rizobios como una colección polifilética de géneros. Concretamente, son nueve los géneros pertenecientes a este orden que contienen rizobios: *Bradyrhizobium*, *Ochrobactrum*, *Azorhizobium*, *Devosia*, *Methylobacterium*, *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Ensifer* (clásicamente denominado *Sinorhizobium*), y *Rhizobium* (Madigan *et al*., 2015). Recientemente, se ha demostrado que algunos miembros de las clases Beta- y Gammaproteobacteria también tienen la capacidad para nodular leguminosas, (Gyaneshwar *et al*., 2011).

2. El Proceso simbiótico rizobio-leguminosa

La simbiosis rizobio-leguminosa es el resultado de millones de años de coevolución, constituyendo un proceso complejo y exquisitamente regulado que juega un importante papel porque ofrece la capacidad de convertir el N_2 atmosférico en formas asimilables por la planta (Rivas *et al*., 2009); siendo además, el proceso que más contribuye a la fijación de N_2 en la Tierra (Sprent, 2001).

La simbiosis comienza con el intercambio de señales químicas entre la planta y la bacteria. Las raíces de las plantas secretan flavonoides, variando éstos según la especie de la planta y siendo reconocidos única y específicamente por algunas especies de rizobios, dando lugar al primer nivel de especificidad de la simbiosis (Hassan y Mathesius, 2012). Los flavonoides difunden a través de la membrana del rizobio y son

percibidos por la proteína NodD, un regulador transcripcional de la familia LysR, que activa la transcripción de los diversos genes implicados en la nodulación, entre ellos los responsables de la producción de los factores Nod (Wang *et al*., 2012).

La curvatura del pelo radical y el *crack entry* son los dos mecanismos de infección usados por la bacteria. El *crack entry* implica la entrada de los rizobios a través de roturas en las raíces laterales o los tallos (Goormachtig *et al*., 2004). La curvatura del pelo radical depende del reconocimiento de los factores Nod, este reconocimiento provoca una oscilación de los niveles de calcio y la subsiguiente cascada de señalización que provoca la curvatura del pelo radical (Esseling *et al*., 2003), (Figura 1).

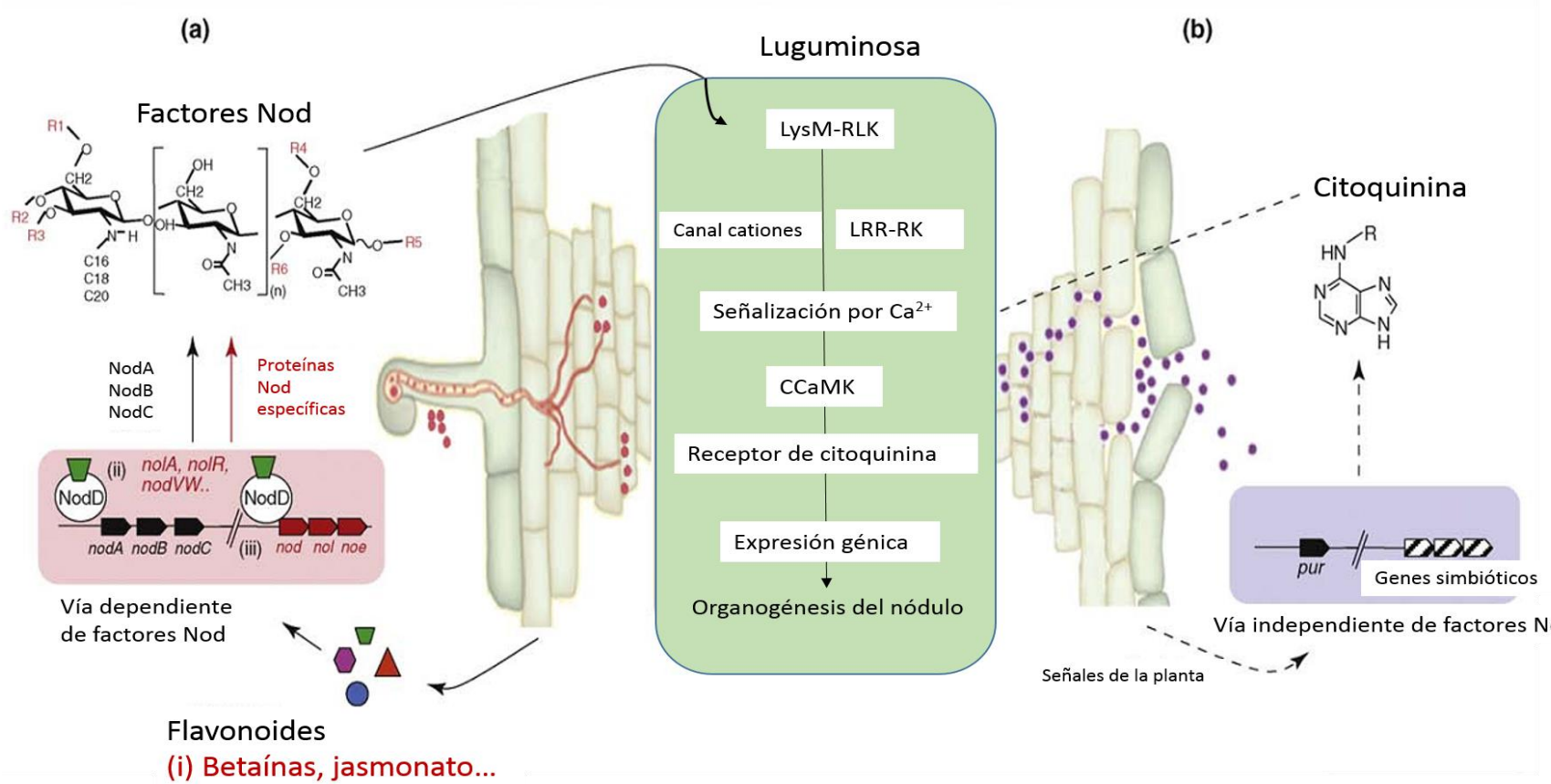


Figura 1. Estrategias de nodulación en los rizobios. a) Inducción de la formación de nódulos en las leguminosas por la vía dependiente de los factores Nod. Se indican en rojo los compuestos o genes variables: (i) compuestos alternativos excretados por la planta, (ii) reguladores posteriores a *nodD* que pueden modular la expresión de los genes *nod*, (iii) aunque el esqueleto de los factores Nod es controlado por los genes *nodABC*, la combinación con otros genes de nodulación (*nol* y *noe*), específicos de estirpe, puede variar las decoraciones de los factores Nod. b) Proceso de formación del nódulo independiente de los factores Nod. La acumulación en la zona de infección de compuestos como la citoquinina, sintetizados por la bacteria, podría disparar la organogénesis del nódulo directamente. Figura adaptada a partir de la publicada por Downie, (2007).

El desarrollo del nódulo por la vía dependiente de los factores Nod, comprende una serie de fases, de las que las más importantes son:

(i) Los pelos radicales se curvan para atrapar a la bacteria y producen una invaginación de la pared celular (tubo de infección) a través de la cual la bacteria penetra en las capas profundas de las células de la raíz.

(ii) El reconocimiento de los factores Nod induce una acumulación temporal de flavonoides, la inhibición del transporte de auxinas y la división de las células del córtex de la raíz, dando lugar a la formación del primordio nodular.

(iii) El tubo de infección libera los bacteroides en el primordio nodular, el cual continúa su desarrollo hacia un nódulo funcional (Hirsch, 1992; Perret *et al*., 2000) (Figura 2).

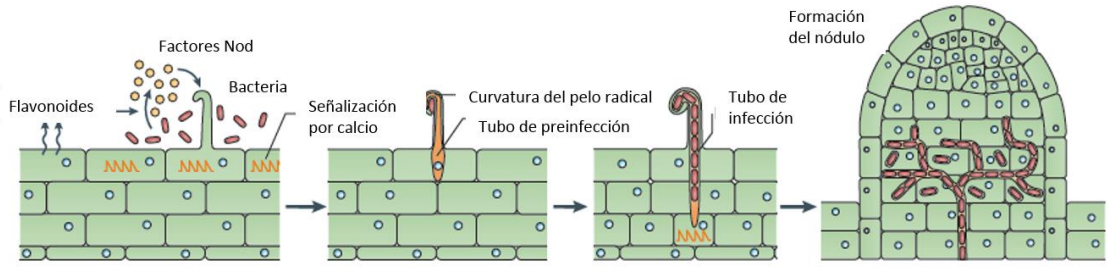


Figura 2. Proceso de desarrollo del nódulo a través de la vía dependiente de factores Nod. Figura modificada de Oldroyd, (2013).

Hay dos tipos principales de nódulos, indeterminados y determinados, y esto depende exclusivamente de la leguminosa. Los nódulos indeterminados comienzan la división celular en el córtex interno (Ferguson *et al*., 2010). Éstos mantienen un meristemo persistente y forman distintas zonas: zona de invasión del rizobio, zona de fijación activa de N_2 y zona de senescencia (Udvardi y Poole, 2013). Estas zonas contienen rizobios en distintos estados de desarrollo y la zona proximal pierde la capacidad para reproducirse (Mergaert *et al*., 2006), (Figura 3A). Sin embargo, la división celular en los nódulos determinados comienza en el córtex externo (Ferguson *et al*., 2010). Estos nódulos no tienen un meristemo persistente y contienen un grupo homogéneo de rizobios con total viabilidad (Saeki, 2011), (Figura 3B).

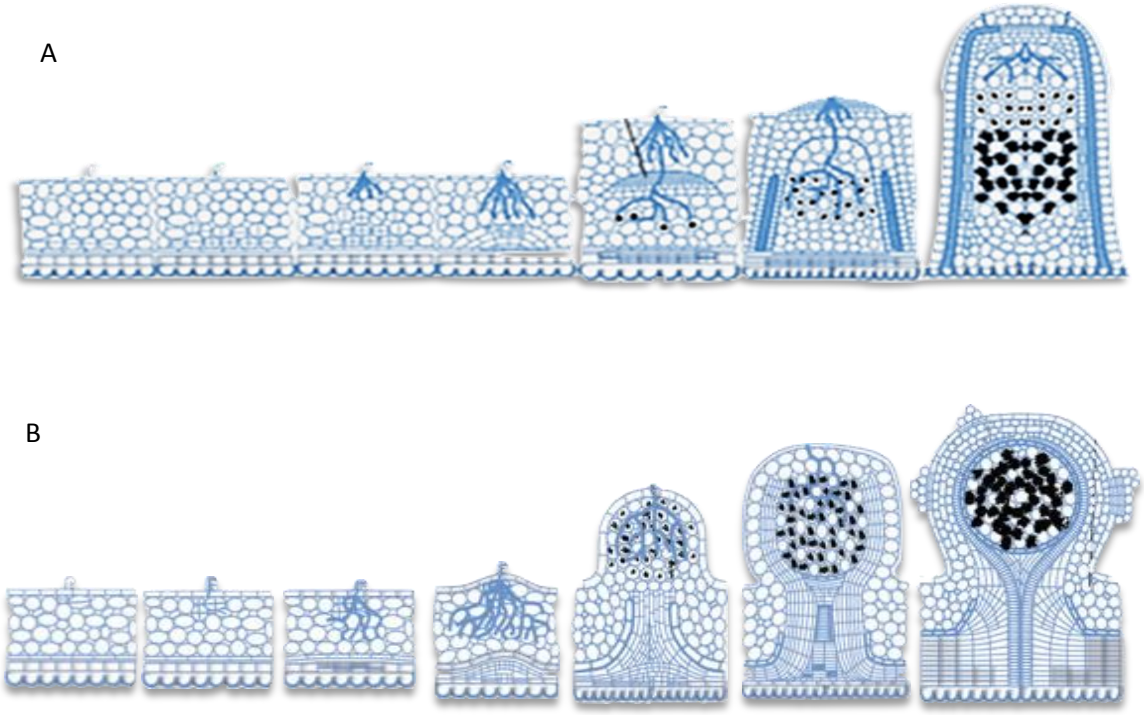


Figura 3. Desarrollo nodular. A, Estructura durante las fases del desarrollo de un nódulo indeterminado. B, Estructura durante las fases del desarrollo de un nódulo determinado, (Ferguson *et al*., 2010).

En la formación del nódulo pueden intervenir estrategias moleculares que influyen en la diferenciación del rizobio a bacteroide en el interior del nódulo. Se conocen tres tipos diferentes de bacteroides, E, S y U que están determinados por el clado al que pertenece la leguminosa hospedadora (Vasse *et al*., 1990; Mergaert *et al*., 2006; Oono *et al*., 2010; Bonaldi *et al*., 2011; Haag *et al*., 2011, 2013; Kondorosi *et al*., 2013). En el clado IRLC (Inverted Repeat Lacking sequence Clade), que incluye leguminosas como *Medicago*, *Pisum*, *Vicia*, *Trifolium*, *Glycyrrhiza*, *Galega* y *Astragalus* (Wojciechowski *et al*., 2000; Terpolilli *et al*., 2012), los rizobios están sometidos a endorreduplicación, acoplado al aumento del tamaño celular (Paau *et al*., 1979, Kobayashi *et al*., 2001, Mergaert *et al*., 2006). Los bacteroides están elongados (bacteroides de morfotipo E) y diferenciados a término (Mergaert *et al*., 2006). En el clado Dalbergoides, que contiene los géneros *Aeschynomene* y *Arachis* (Bonaldi *et al*., 2011), el bacteroide también está sometido a endorreduplicación y alargamiento celular y dependiendo de la especie de la planta, pueden ser elongados (morfotipo E) o esféricos (morfotipo S). Sin embargo, en leguminosas del clado Millettoides-Phaseoloides, como *Phaseolus*, *Vigna*, *Lotus* y *Glycine*, los rizobios no están sometidos a una diferenciación a término, los bacteroides presentan

una forma celular, tamaño y contenido en ADN, similar al de vida libre (morfotipo U) (Paau *et al*., 1979; Mergaert *et al*., 2006). En leguminosas pertenecientes al clado IRLC, la diferenciación del bacteroide está determinada por factores de ambos simbiontes. Estas leguminosas producen un conjunto de péptidos antimicrobianos, únicamente dentro del nódulo, que causan endorreduplicación del genoma de la bacteria y fuerzan al rizobio a entrar en un estado de no crecimiento (Mergaert *et al*., 2003, 2006; Van de Velde *et al*., 2010; Bonaldi, *et al*., 2011; Marshall *et al*., 2011; Penterman *et al*., 2014). A estos péptidos se les conoce como NCR (Nodule-specific Cysteine-Rich) (Mergaert *et al*., 2003; Haag *et al*., 2012) y todos presentan un patrón específico de cuatro o seis residuos conservados de cisteína. Por parte de la bacteria, la proteína BacA está implicada en la diferenciación del bacteroide en los nódulos de leguminosas del clado IRLC. Por consiguiente, un mutante *bacA* de *Ensifer meliloti* fracasa en la diferenciación dentro de células nodulares de *Medicago*, y rápidamente mueren por su hipersensibilidad a los péptidos NCR producidos por estas células (Glazebrook *et al*., 1993; Haag *et al*., 2011), en consecuencia no fijan N_2 y no pueden mantener el crecimiento de la planta. Sin embargo, el gen *bacA* de los rizobios no se requiere para la persistencia de la bacteria y la fijación de N_2 en los nódulos de las plantas hospedadoras que no producen péptidos (Haag *et al*., 2011).

3. Características de los rizobios

A pesar de la diversidad genética, está claro que los diferentes géneros de los rizobios tienen muchas características genéticas y bioquímicas comunes que están relacionadas con su capacidad para establecer simbiosis efectivas. Estos factores comunes incluyen las ya mencionadas capacidades de reconocer señales moleculares específicas, como los flavonoides de las plantas hospedadoras y de producir señales moleculares especiales, tales como los factores Nod. Además, otros factores comunes incluyen adaptaciones estructurales especializadas y la regulación especial de algunos tipos de moléculas que también están presentes en muchas otras bacterias del suelo. Estas moléculas están implicadas en funciones especializadas durante el establecimiento de la simbiosis como: adaptación a las diferentes condiciones de crecimiento, supervivencia ante la presencia de muchos compuestos potencialmente tóxicos (compuestos fenólicos y enzimas) y en la necesidad de evitar la respuesta de defensa de la planta.

3.1 Genes simbióticos

Los genes esenciales para la nodulación, infección y fijación de N_2 están agrupados en módulos simbióticos que contienen los genes implicados en la síntesis, procesamiento y transporte de los factores Nod (*nod/nol/noe*), de los cuales los más conservados son *nodABCDIJ* y *nifABHDKENT* (Remigi *et al*., 2015). La única excepción la constituye un grupo de bradyrhizobios que no poseen genes de nodulación canónicos e inician la nodulación sin factores Nod (Giraud *et al*., 2007). Estos módulos de genes simbióticos se encuentran agrupados en elementos genéticos transmisibles, como grandes plásmidos presentes en todos los géneros de rizobios (Galibert *et al*., 2001) y grandes elementos transponibles, como las llamadas islas simbióticas flanqueadas por secuencias de inserción, presentes en *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium japonicum* (Sullivan *et al*., 2002). En el caso de *B. japonicoum* USDA 110, la isla simbiótica tiene un tamaño de 681 kb y porta un grupo de genes simbióticos con bajo contenido en GC. Junto a la isla simbiótica se encuentran 14 pequeñas islas genómicas (4-97 kb) (Kaneko *et al*., 2002), que son regiones de ADN adquiridas horizontalmente que normalmente se insertan en las inmediaciones de los genes de ARNt en el cromosoma y están flanqueadas por secuencias directas repetidas (Dobrindt *et al*., 2004). Las islas genómicas presentan frecuentemente un contenido en GC distinto al del resto del cromosoma y albergan varios genes que codifican proteínas implicadas en patogenicidad, degradación de compuestos xenobióticos, absorción de hierro, resistencia a antibióticos, metabolismo secundario o simbiosis (Dobrindt *et al*., 2004).

3.2 Superficie celular

Otras características de los rizobios que también pueden tener implicación simbiótica son: el metabolismo del carbono y del nitrógeno (Kahn *et al*., 1998; Kaminski *et al*., 1998), las características de la superficie celular (Brewin 1998; Kannenberg *et al*., 1998), el mecanismo de *quorum sensing* (QS), la secreción de efectores (Finnie *et al*., 1997; Finnie *et al*., 1998; Viprey *et al*., 1998; York y Walker, 1997) y los sistemas de absorción especializados (Kahn, 1998; Lugtenberg, 1998; Willis y Walker, 1999), entre otros. En relación al reconocimiento especializado entre los rizobios y las plantas hospedadoras, son importantes los componentes estructurales de la superficie celular de los rizobios y la regulación de la producción de los mismos. Moléculas como los polisacáridos

capsulares o KPS, que se unen normalmente a la membrana externa (Rodríguez-Navarro et *al*., 2007); los glucanos cíclicos (Breedveld y Miller, 1998; Rodríguez-Navarro *et al*., 2007) que se encuentran principalmente en el espacio periplásmico o bien liberados al medio de cultivo en cultivo *in vitro*; los lipopolisacaridos [LPS (Becker y Pühler, 1998)], componentes estructurales de la membrana externa (Rodríguez-Navarro *et al*., 2007) y los polisacáridos extracelulares [EPS (Becker y Pühller, 1998)], débilmente asociados con la membrana externa o totalmente liberados al medio extracelular (Rodríguez-Navarro *et al*., 2007). Todos ellos son de enorme importancia, como demuestra el reciente descubrimiento en *Lotus japonicus*, donde un receptor específico que reconoce el EPS de bacterias compatibles e incompatibles y que controla la entrada de la bacteria a través de la pared celular de las células epidérmicas de la planta (Kawaharada *et al*., 2015).

La necesidad de determinados polisacáridos superficiales para el establecimiento de la simbiosis depende de la especie del rizobio. Se ha visto que cepas de *E. meliloti* que producen únicamente EPS o KPS, son efectivas en la simbiosis con alfalfa (Pellock *et al*., 2000). Sin embargo, en *Ensifer fredii* HH103 EPS y KPS no son equivalentes, el KPS es de crucial importancia para su capacidad simbiótica, pero no así el EPS, ya que mutantes de esta estirpe en genes *rkp* están afectados simbióticamente, produzcan o no EPS, (Paradas *et al*., 2006).

Las plantas han desarrollado varios mecanismos de defensa contra las infecciones bacterianas como son la producción de compuestos antimicrobianos, fitoalexinas y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Matamoros *et al*., 2003; D'Haeze y Holsters, 2004). Esto ha llevado a que, tanto patógenos de plantas como simbiontes posean diversas estrategias para evadir los sistemas de defensa de las plantas y protegerse de ellos; entre esas estrategias, los polisacáridos superficiales de los rizobios tienen una función protectora primordial (D'Haeze y Holsters, 2004). De hecho, cambios en la estructura de los polisacáridos superficiales, generalmente resultan en un aumento de la sensibilidad frente a los compuestos antimicrobianos. Un ejemplo es el EPS I de bajo peso molecular de *E. meliloti* cuya función como supresor de la respuesta de la planta es muy importante en la simbiosis con *Medicago sativa* (Niehaus *et al*., 1996). Además, el EPS de los rizobios tiene un papel muy importante en la formación de *biofilm*, al igual que ocurre en otras bacterias, siendo el mayor componente de la matriz, lo cual

aporta una barrera física contra la difusión de productos tóxicos y protección contra diferentes tipos de estrés medioambiental (Rinaudi y Giordano, 2010).

Por otro lado, se ha descrito que muchos rizobios con mutaciones en el LPS son deficientes en simbiosis porque probablemente inducen una mayor respuesta defensiva por parte del hospedador y/o porque son más sensibles a los sistemas de defensa de la planta. El patrón de ácidos grasos del lípido A del LPS, parece tener un papel crucial suprimiendo la producción de ROS en la planta (Scheidle *et al*., 2005; Tellstrom *et al*., 2007), además parece reducir la expresión en la planta de genes implicados en la respuesta de defensa como la fenil alanina amonio liasa (Tellstrom *et al*., 2007).

En este contexto, cabe destacar que la simbiosis rizobio-leguminosa, además del aporte de nitrógeno a la planta hospedadora, promueve la activación de los mecanismos de resistencia frente a patógenos por la vía Resistencia Sistémica Inducida (ISR), como se ha visto en plantas de arroz inoculadas con *Rhizobium leguminosarum* biovariedad trifolii cuya producción de compuestos fenólicos se ve incrementada, resultando en una respuesta ISR bajo condiciones de estrés por patógenos (Mishra *et al*., 2006). Otro caso ha mostrado

que el LPS de *R. etli* produce ISR que protege a las raíces de la patata frente a las infecciones por nematodos, (Carlson *et al*., 2010).

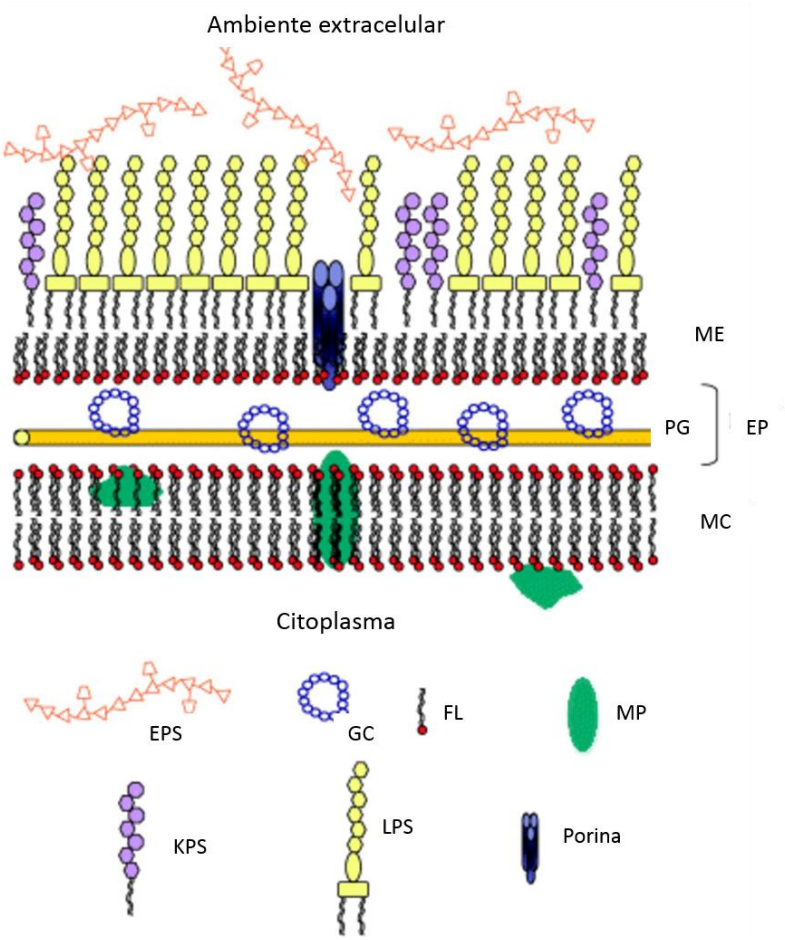


Figura 4. Esquema de la superficie celular de los rizobios, mostrando la posición de los polisacáridos de superficie que podrían estar implicados en la unión del rizobio con la raíz de la leguminosa hospedadora. ME: Membrana externa, EP: espacio periplásmico, PG: capa de peptidoglicano, EPS: exopolisacárido, GC: glucanos cíclicos, FL: fosfolípidos, MP: proteína de membrana, KPS: polisacárido capsular, LPS: lipopolisacárido. (Rodríguez-Navarro *et al*., 2007).

3.3 Quorum sensing (QS)

Muchas bacterias regulan su expresión génica en respuesta a cambios en la densidad de población en un proceso llamado *quorum sensing*, el cual está mediado por pequeñas moléculas señal difusibles llamadas autoinductores (AI) (Fuqua *et al*., 1994; Miller y Bassler, 2001). Los genes regulados por QS están implicados en cambios adaptativos en la fisiología de las poblaciones bacterianas, adaptando y modificando su comportamiento cuando se alcanza una cierta densidad celular. En bacterias Gram negativas, los principales AI se han identificado como N-acil-homoserina lactona (AHL), y su producción se ha detectado en bacterias asociadas a plantas pertenecientes a los

géneros *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Ensifer*, *Pantoea*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xantomonas* (Cha *et al*., 1998), entre otros. Los genes controlados por QS, modulan una amplia variedad de fenotipos, virulencia, transferencia de plásmidos, producción de toxinas, inhibición del crecimiento, adaptación a la fase estacionaria, formación de *biofilm*, producción deEPS, movilidad, eficiencia en la nodulación, desarrollo del simbiosoma y fijación de nitrógeno, los cuales son esenciales para un establecimiento exitoso de la simbiosis o para la relación patogénica con hospedadores eucariotas (Pérez-Montaño *et al*., 2011 y 2013).

Los rizobios se han descrito como formadoras de microcolonias o *biofilm*, la formación de *biofilm* es un proceso altamente regulado en el cual los componentes de la superficie bacteriana, especialmente EPS, flagelos y LPS en combinación con la presencia de señales bacterianas de QS, juegan un papel esencial (Rinaudi y Giordano, 2010). La estructura tridimensional del *biofilm* se debe a una matriz extracelular que está formada por EPS (Sutherland, 2001) y factores Nod en el caso de *E. meliloti* (Fujishige *et al*., 2008). La formación de *biofilm* permite a las bacterias del suelo colonizar los habitas de alrededor, y sobrevivir a los tipos de estrés más comunes, como la desecación y la limitación de nutrientes, (Pérez-Montaño *et al*., 2013).

3.4 Movilidad

A lo largo de la evolución las bacterias han ido adquiriendo capacidades que les han permitido adaptarse a las condiciones ambientales desfavorables. Entre estas capacidades se encuentra la movilidad, que les confiere mayor eficacia en obtención de nutrientes, acceder a mejores nichos, evitar el efecto de sustancias tóxicas o una mejor dispersión bacteriana en el medio ambiente.

Dependiendo de las propiedades hidrofílicas del medio, se ha descrito que las bacterias pueden emplear al menos seis tipos distintos de movilidad. En medios líquidos las bacterias emplean la movilidad tipo *swimming* y sobre superficies sólidas o semi-sólidas se dan los siguientes tipos: *swarming*, *sliding*, *twitching*, *gliding* y el recientemente descrito *surfing*. (Figuras 5 y 6). El *swimming* es un movimiento dependiente de flagelos, se da en medios acuosos y en superficies que presentan un fluido denso sobre ellas y se caracteriza por un patrón de movimiento bacteriano desorganizado. El *swarming* es un tipo de translocación bacteriana dependiente de flagelos y se caracteriza por el

movimiento rápido y coordinado de toda una población sobre una superficie. Sin embargo, el *sliding*, es un movimiento independiente de flagelos que se produce por la expansión de una colonia en crecimiento y la reducción de tensiones superficiales debido a la excreción de agentes surfactantes. Por otro lado, el *twitching* es un tipo de movilidad sobre superficies presentado por células individuales que tiene lugar debido a la extensión y retracción de pili tipo IV. Por último, el *gliding* no requiere la presencia de flagelos o pili pero implica componentes de adhesión focal, estos componentes anclan la bacteria al substrato y posiblemente actúan como motor, (Kearns, 2010). Recientemente se ha descrito un nuevo tipo de movilidad en superficie en *E. meliloti*, la movilidad tipo *surfing*, (Dilanji *et al*., 2014) de la que con algunas diferencias ya se habló en *Pseudomonas aeruginosa* (Yeung *et al*., 2012) y que se caracteriza por una acumulación de EPSII en la colonia, lo que provoca la entrada de agua desde el agar del medio de cultivo para regular el equilibrio osmótico y las bacterias se deslizan sobre la superficie del agua que entra en la colonia, produciéndose así la expansión de la misma.

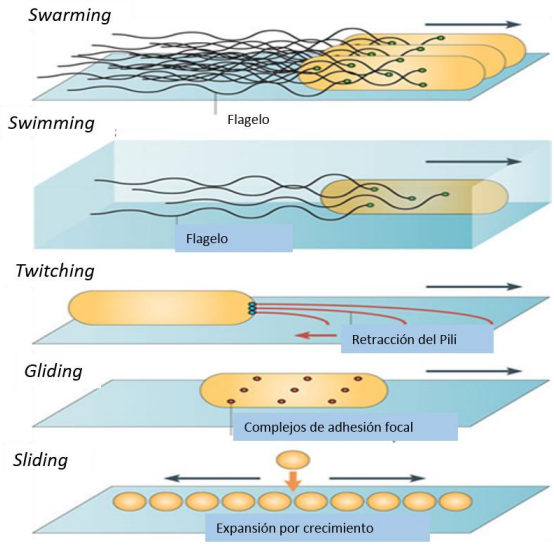


Figura 5. Tipos de movilidades bacterianas: swarming, swimming, twitching, gliding y sliding. Figura modificada de Kearns (2010).

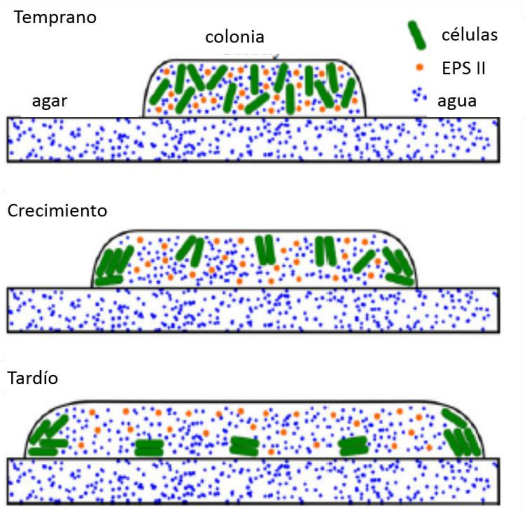


Figura 6. Movilidad tipo *surfing*. Figura adaptada de Dilanji *et al*. (2014)

3.5 Sistemas de secreción

Como se ha mencionado, para formar nódulos funcionales, los rizobios utilizan un amplio panel de herramientas moleculares, incluidos los sistemas de secreción

especializados, (Deakin y Broughton, 2009; Fauvart y Michiels, 2008). Los sistemas de secreción de tipo III, IV y VI se conocen en bacterias patógenas por su función de transporte de efectores y proteínas, por su efecto en la especificidad de hospedador y su función como determinantes del número de nódulos en las leguminosas en general.

El complejo del Sistema de Secreción de tipo III (T3SS) atraviesa la membrana externa, así como las membranas del hospedador y permite el transporte de proteínas desde la bacteria al interior de la célula vegetal. La influencia del T3SS en la nodulación puede variar desde positiva, aumentando la nodulación, a negativa, donde la nodulación se reduce (Nelson y Sadowsky, 2015). En *E. fredii* NGR234, el T3SS tiene ambos efectos sobre leguminosas diferentes e incluso puede tener un fenotipo neutro en el que la nodulación no se ve afectada, como ocurre por ejemplo en *Vigna unguiculata* (Viprey *et al*., 1998; Skorpil *et al*., 2005; Kambara *et al*., 2009). La secuenciación de otros genomas rizobianos y la identificación de los genes de la región *tts* en otras estirpes, como HH103 y USDA257 de *E. fredii*, *B. japonicum* USDA110 y *M. loti* MAFF303099 (de Lyra *et al*., 2006; Hubber *et al*., 2004; Kaneko *et al*., 2000; Krause *et al*., 2002; Krishnan *et al*., 2003), han permitido estudiar el efecto del T3SS en la simbiosis con sus respectivas leguminosas hospedadoras y, al igual que ocurría con la estirpe NGR234, la inactivación del T3SS afecta a la simbiosis dependiendo de la planta hospedadora. En el caso concreto de la simbiosis *E. fredii* HH103-soja, la inactivación del sistema de secreción de T3SS afecta negativamente al establecimiento de la misma en los estadios tempranos del proceso, lo cual está asociado con la reducción de la expresión de los genes de nodulación temprana. Este fenotipo simbiótico podría ser consecuencia de que la bacteria desencadene la respuesta de defensa asociada a la producción de ácido salicílico y la deficiencia del mutante en el T3SS para suprimir dicha respuesta (Jiménez-Guerrero *et al*., 2015).

Estos resultados parecen indicar que el T3SS en los rizobios está involucrado en el rango de hospedador de la bacteria y en la eficiencia de la nodulación (Yang *et al*., 2010).

El Sistema de Secreción de tipo IV (T4SS) es funcionalmente similar al T3SS y también está implicado en la secreción de proteínas, pero con un origen diferente en la evolución. El T4SS se divide, generalmente, en tres familias basadas en la función:

conjugación, importación y exportación de ADN y traslocación de proteínas (Cascales y Christie, 2003). Un T4SS funcional sólo se ha identificado en tres especies diferentes, *M. loti* R7, *E. meliloti* KH35c y *Ensifer medicae* M2 (Nelson y Sadowsky, 2015). De forma similar al T3SS, el T4SS puede tener un efecto positivo o negativo en simbiosis.

El Sistema de Secreción de tipo VI (T6SS) está entre los últimos sistemas de secreción investigados implicado en la secreción de proteínas. El T6SS se conoce por tener diferentes subfamilias, pero las subfamilias y sus funciones aún no están bien definidas. Las secuencias que codifican el T6SS se ha encontrado en varias especies de rizobios: *R. leguminosarum*, *B. japonicum*, *M. loti*, *Ensifer saheli* y *E. fredii* (Bladergroen *et al*., 2003; Bingle *et al*., 2008; Sugawara *et al*., 2013). Sin embargo, un T6SS funcional con efecto en la simbiosis sólo se ha visto en *R. leguminosarum*; donde produce un efecto negativo en la simbiosis, al impedir la nodulación en *Pisum sativum* cv. Rondo (Bladergroen *et al*., 2003).

3.6 Estructura, biosíntesis y secreción de los factores Nod

Los factores Nod consisten en un esqueleto oligosacarídico de uniones β-1,4 de N-acetil-D-glucosamina donde el extremo no reductor está N-acilado con un ácido graso (Figura 7A) exceptuando el producido por *E. fredii* USDA 191, que está formado por un pentámero con una glucosa insertada en el centro del esqueleto de oligosacarídico (Figura 8) (Bec-Ferté *et al*., 1996). Debido al parecido de este esqueleto con un fragmento de quitina, los factores Nod también reciben el nombre de lipo-quitin-oligosacaridos (LCO). La estructura del principal LCO producido por *E. meliloti* se muestra en la Figura 7B. Todos los rizobios parecen producir una mezcla compleja de especies de LCO.

Las diferencias en la estructura ocurren como resultado de las siguientes variaciones:

(i) Variación en el número de unidades de N-acetil-D-glucosamina. Los LCO normalmente varían en longitud, estando constituidos por entre tres y seis unidades; sin embargo, se ha descrito una estirpe de *M. loti* que produce un tipo de LCO dimérico (Olsthoorn *et al*., 1998).

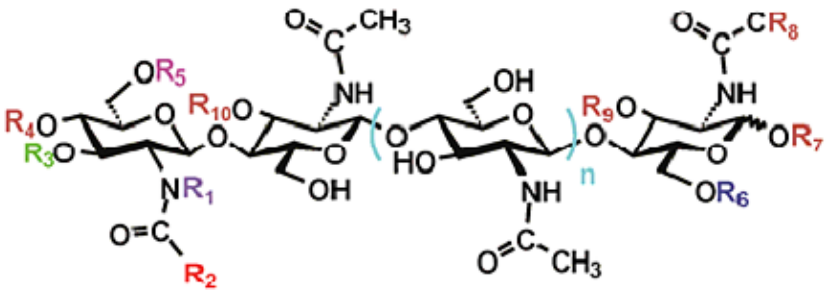
(ii) La presencia o ausencia de sustituyentes específicos de estirpe. En términos de número de sustituyentes, se pueden distinguir estirpes bacterianas que producen LCO con sólo unas pocas modificaciones, como cepas de *R. leguminosarum* bv. viciae que

contienen un sustituyente acetilo en posición R4 o muchas modificaciones como *E. fredii* NGR234.

(iii) Variaciones en la estructura de la mitad N-acilada con un ácido graso. Los LCO pueden contener uno de entre una amplia variedad de grupos acilos grasos que también son comunes en los fosfolípidos. Se piensa, que la ratio de los tipos comunes de sustituyentes acilos refleja la composición del conjunto de acilos grasos que están presentes como componentes de los fosfolípidos.

(iv) La presencia o ausencia de acilos α o β-insaturados. Estos pueden estar presentes en los LCO producidos por *E. meliloti*, *R. leguminosarum* biovariedades viciae y trifolii, *Rhizobium galegae* y *Mesorhizobium huakuii*. La abundancia relativa de LCO que contengan un acilo especial (en comparación con los acilos comunes) en las mezclas producidas varía considerablemente en las diferentes cepas estudiadas (Lerouge *et al*., 1990; Spaink *et al*., 1995; Spaink *et al*., 1991; Yang *et al*., 1999).

A



B

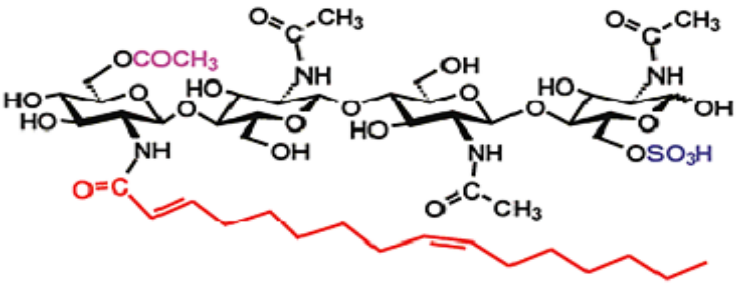


Figura 7. Estructura de los factores Nod. A, LCO genérica mostrando los sitios de sustitución, n es generalmente 1 ó 2, lo cual conduce a LCO tetrámeros o pentámeros. B, Estructura del principal LCO producido por *E. meliloti* NodSm-IV (C16:2Δ2EΔ9Z, Ac, S). Ac: acetilo, S: sulfato. (Lerouge *et al*., 1990; Truchet *et al*., 1991). (Cough y Cullimore, 2011).

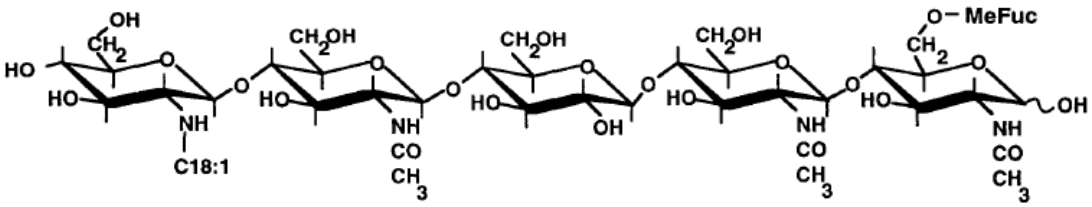


Figura 8. Estructura del LCO producido por *E. fredii* USDA 191. Estructura completa NodRf-V-Glc($C_{18:1}$, MeFuc), MeFuc: metil fucosa. (Bec-Ferté *et al*., 1996).

Las proteínas que juegan un papel en la biosíntesis de la LCO están codificadas por los genes *nod*, *nol* y *noe*. Para algunas de estas proteínas, los análisis bioquímicos han dilucidado sus actuaciones en la ruta biosintética que dirige a la producción de LCO, incluyendo algunas modificaciones específicas de estirpe (Downie, 1998; Kamst *et al*., 1998; Spaink, 1996). Las proteínas NodC, NodB y NodA tienen su función en la biosíntesis del esqueleto de los LCO por su actividad como quitín oligosacárido sintasa, quitín oligosacárido deacetilasa y acil transferasa respectivamente (Atkinson *et al*., 1994; Geremia *et al*., 1994; John *et al*., 1993; Röhrig *et al*., 1994; Spaink *et al*., 1994). Las funciones de las proteínas NodC y NodA se conocen por ser específicas en varias especies de rizobio. En particular, las proteínas NodC de *E. meliloti*, *M. loti* y *R. leguminosarum* son diferentes en la longitud media de la cadena oligosacarídica que producen (Kamst *et al*., 1997; Roche *et al*., 1996) y las proteínas NodA de *R. leguminosarum* y *E. meliloti* están especializadas en la transferencia de acilos α, β-insaturados (Geiger *et al*., 1998; Ritsema *et al*., 1996; Roche *et al*., 1996). La cadena acilada es sintetizada por las proteínas NodE y NodF, la O-sulfatación ocurre por NodH, NodP y NodQ y la O-acetilación la lleva a cabo NodL.

Los LCO, tras el cultivo de los rizobios en medios adecuados a los que se añade el flavonoide específico, se secretan al medio de cultivo, de donde se pueden aislar para su análisis químico. Esto indica la existencia de mecanismos de secreción (Spaink, 1996). Debido a que los LCO son moléculas mayoritariamente hidrofóbicas, podrían estar presentes en el medio como formas multiméricas o estar unidos a compuestos transportadores como los glucanos cíclicos extracelulares o una de las muchas proteínas rizobianas secretadas (Becker *et al*., 1997; Finnie *et al*., 1997; Viprey *et al*., 1998). Los genes *nodI* y *nodJ* que son miembros de la familia de proteínas de transporte de tipo I (Downie, 1998), juegan un papel en la secreción de los LCO. Sin embargo, en mutantes por

deleción de los genes *nodI* y *nodJ*, se han encontrado cantidades sustanciales de LCO secretadas en el medio (Cardenas *et al*., 1996; Fernández-López *et al*., 1996; Spaink *et al*., 1995), indicando que quedan otros mecanismos de transporte operativos. Debido a que es poco probable que los LCO sean capaces de atravesar la doble membrana por un sistema flip-flop (Goedhart *et al*., 1999) los mecanismos de transporte alternativo están, probablemente, mediados por proteínas. Los candidatos son los sistemas proteicos de transporte ABC (ATP Binding Cassette) relacionados con NodI y NodJ, o las proteínas de la bomba de eflujo de tipo RND (Resistance Nodulation and Cell Division), como NolF y NolG, los cuales se encuentran en *E. meliloti* (Baev *et al*., 1991; Saier *et al*., 1994).

3.7 Regulación de la producción de factores Nod en *E. meliloti*

E. meliloti forma nódulos simbióticos fijadores de N_2 en especies del género *Medicago*, como *Medicago. truncatula* y *M. sativa*. La expresión de los genes de nodulación y de los de fijación de N_2 está regulada de manera positiva y negativa para una nodulación óptima y un metabolismo eficiente de la planta en presencia del nitrógeno fijado (Kondorosi *et al*., 1989; Loh y Stacey, 2003). La regulación transcripcional positiva está mediada por el producto de los genes *nodD* y *syrM* (Long, 1996). La proteína NodD se activa por flavonoides específicos e interactúa con las *nod box* (secuencias conservadas situadas en regiones promotoras) que se encuentran corriente arriba de los genes de nodulación comunes, de los específicos de hospedador y de los específicos de genotipo para inducir su expresión (Loh y Stacey, 2003; Sadowsky *et al*., 1991). En *E. meliloti*, la regulación negativa está mediada por una proteína represora codificada por el gen *nolR*; este gen fue identificado primero en *E. meliloti* AK631 como un regulador transcripcional negativo de los principales genes biosintéticos de los factores Nod (*nodABC*) (Kondorosi *et al*., 1989; 1991). La proteína NolR se une a la región promotora solapante de los genes *nodD1* y *nodA*, en la zona de unión de la ARN polimerasa (Cren *et al*., 1995). Mutantes de *E. meliloti* AK631 que carecen del gen *nolR* sobreproducen factores Nod que carecen de la decoración correcta, esto determina una menor eficiencia del inicio de la nodulación en alfalfa (*M. sativa*) (Kondorosi *et al*., 1989). Además, los análisis de proteómica indican que la proteína NolR probablemente regula la expresión de otros genes (Chen *et al*., 2005).

4. Taxonomía de los rizobios

Desde el año 2000 se han producido cambios en la taxonomía de todas las bacterias, ya que a partir de entonces el gen que codifica el ARNr 16S ha sido el gen obligatorio para la descripción de las especies bacterianas. Aunque la nodulación con las leguminosas no se excluyó como criterio en la taxonomía de los rizobios, pasó a ser secundario en la descripción de especies. Esto supuso un cambio revolucionario ya que la identificación de estas bacterias era posible independientemente de la planta de aislamiento. Aunque la clasificación actual de las bacterias sigue basándose en la secuencia del gen que codifica el ARNr 16S, éste tiene limitaciones para diferenciar especies altamente relacionadas (Valverde *et al*., 2006; Ramírez-Bahena *et al*., 2008). Por este motivo, se han propuesto varios genes metabólicos (*housekeeping*) en los diferentes grupos de bacterias (Maiden, 2006). En los rizobios, los dos primeros genes analizados fueron *recA* y *atpD* (Gaunt *et al*., 2001) además, se han incluido otros como *glnII* y *rpoB*. Actualmente, estos genes se han secuenciado en muchas especies, demostrándose su utilidad en la diferenciación de especies cuyo gen ARNr 16S es prácticamente idéntico (Valverde *et al*., 2006; Ramírez-Bahena *et al*., 2008).

Por esta razón, en las descripciones de nuevas especies de los rizobios se ha incluido el análisis de, al menos, dos genes *housekeeping* para conocer la relación entre especies cercanas, antes de realizar experimentos de hibridación ADN-ADN (Rivas *et al*., 2009).

Además de los genes *housekeeping*, otros genes auxiliares o accesorios implicados en la simbiosis rizobio-leguminosa también se han incluido en la descripción de especies de rizobio (Silva *et al*., 2005; Vinuesa *et al*., 2005b). Los genes simbióticos más estudiados son *nodD*, *nodA*, *nodC* y *nifH* (Laguerre *et al*., 2001; Silva *et al*., 2005; Stepkowski *et al*., 2007; Laranjo *et al*., 2008; Steenkamp *et al*., 2008; Zhao *et al*., 2008; Estrella *et al*., 2009). No obstante, los genes simbióticos no son útiles en taxonomía debido a su capacidad para transferirse horizontalmente en la naturaleza (Mergaert *et al*., 1997; Finan, 2002), desde plásmidos a islas (Nakatsukasa *et al*., 2008), desde bacterias a plantas (Broothaerts *et al*., 2005) y entre bacterias (Rogel *et al*., 2001). Sin embargo, los genes de nodulación son muy útiles para definir biovariedades dentro de las especies de rizobios (Rivas *et al*., 2007; Villegas *et al*., 2006; Mnasri *et al*., 2007; León-Barrios *et al*., 2009).

Actualmente el género *Rhizobium* contiene 86 especies, 18 el género *Ensifer* y 32 del género *Mesorhizobium*, frente a las 27 de *Bradyrhizobium*. Además, los géneros *Allorhizobium* y *Azorhizobium* cuentan con 1 y 3 especies respectivamente, (http://www.bacterio.net/)

5. Simbiovariedades

En diversas especies bacterianas se han descrito biovariedades (variantes biológicas) que ponen de manifiesto diferencias bioquímicas y características enzimáticas dentro de una especie. Una biovariedad (bv.) representa un grupo de cepas de bacterias distinguibles de otras cepas de la misma especie en base a características fisiológicas o bioquímicas. Las biovariedades se conocían formalmente como biotipos. En los rizobios, las biovariedades se han usado para distinguir diferentes subgrupos simbióticos dentro de una única especie, aunque especies diferentes pueden compartir la misma biovariedad, debido a la transferencia lateral de información simbiótica (Rogel *et al*., 2011). Las biovariedades se describieron primero en *R. leguminosarum* (Jordan, 1984), ejemplos de ellas son la bv. viciae, que nodula guisante y las biovariedades trifolii y phaseoli que nodulan trébol y judía, respectivamente, considerando que hay una única especie bacteriana (un fondo cromosómico común), que alternativamente puede contener plásmidos simbióticos con diferentes especificidades. Desde entonces las biovariedades se han identificado en otros géneros de los rizobios como *Ensifer*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* (Amarger *et al*., 1997; Ba *et al*., 2002; Lorquin *et al*., 1997; Mnasri *et al*., 2007; Radeva *et al*., 2001; Rincón-Rosales *et al*., 2009; Silva *et al*., 2005; Villegas *et al*., 2006; Vinuesa *et al*., 2005a; Wang *et al*., 1999).

Rogel *et al*. (2011) sugirieron que el término simbiovariedad (sv.) podría usarse de forma similar en base a las capacidades simbióticas de un grupo de cepas con las plantas hospedadoras, distinguiéndose por tener diferente rango de hospedador y apoyado por la secuencia de los genes simbióticos. Para la mayoría de las bacterias, la noción biovariedad está ligada a variedad biológica. En el caso de la simbiovariedad, se considera que la planta hospedadora es la fuente de variabilidad, infiriendo que podría usarse bien el término biovariedad o simbiovariedad, aunque el término simbiovariedad es más preciso y certero teniendo en cuenta que se refiere a propiedades simbióticas.

El intercambio de genes simbióticos entre varios fondos genéticos vía transferencia horizontal se conoce desde hace mucho tiempo (Pérez-Mendoza *et al*., 2005; Sullivan y Ronson, 1998). La adquisición de nuevas capacidades simbióticas por transferencia lateral de elementos simbióticos móviles ha sido la razón por la que normalmente se explicaban las incongruencias entre las filogenias de los genes cromosómicos y simbióticos, ya que está documentado que las filogenias basadas en los genes de nodulación (*nod*) generalmente no son congruentes con aquellas que se basan en el gen que codifica el ARNr 16S, pero muestran correlación con el rango de hospedador (Dover *et al*., 1994; Haukka *et al*., 1998; Laguerre *et al*., 2001; Ueda *et al*., 1995; Vinuesa *et al*., 2005a; León-Barrios *et al*., 2009). Sin embargo, los genes simbióticos, implicados en las propiedades simbióticas, son excelentes marcadores para una caracterización completa de los rizobios. Genes comunes de nodulación como *nodABC* o genes de nitrogenasa como *nifHDK*, han sido útiles en el estudio de las interacciones planta hospedador (Kaijalainen y Lindström, 1989; Laguerre *et al*., 2001; Meade *et al*., 1982; Villegas *et al*., 2006).

5.1 Simbiovariedades del género *Ensifer*

Dentro de las especies del género *Ensifer, E. meliloti* es la mejor estudiada en cuanto a los mecanismos moleculares implicados en la nodulación. Se sabe de su capacidad para nodular alfalfa, pero también forma nódulos en los géneros *Trigonella* y *Melilotus*.

Dentro de esta especie se han descrito hasta la fecha siete simbiovariedades: meliloti (Villegas *et al*., 2006), acaciae (Ba *et al*., 2002), medicaginis (Villegas *et al*., 2006), mediterranense (Mnasri *et al*., 2007), ciceri (Maatallah *et al*., 2002), lancerottense (León-Barrios *et al*., 2009) y, más recientemente, rigiduloides (Gubry–Rangin *et al*., 2013).

Los aislamientos de *Medicago laciniata*, que también nodulan *Medicago sauvagei* pero no *M. truncatula*, se clasificaron como *E. meliloti* por las características cromosómicas, como el gen ARNr 16S y la hibridación ADN-ADN, pero tienen diferente rango de hospedador, la secuencia de *nodA* y el patrón RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) de los genes *nifDK* justifican su pertenencia a la sv. medicaginis. En el caso de la sv. lancerottense, se distingue por tener un genotipo simbiótico propio y nodular de forma efectiva *Lotus lancerottense* (León-Barrios *et al*.,

2009); ésta es la primera vez que se describió que *E. meliloti* nodule el género *Lotus*, además, las estirpes de esta simbiovariedad se caracterizan por no nodular *Medicago*.
En la filogenia basada en el gen *nodC,* las simbiovariedades lancerottense, mediterranense y ciceri se encuentran en el mismo clado que *E. fredii*, divergiendo de las otras tres simbiovariedades de *E. meliloti* (sv. rigiduloides, sv. medicaginis, sv. meliloti) que se agruparon en un clado consistente junto con *E. medicae*. Miembros de este último clado comparten la capacidad de nodular algunas especies de *Medicago* (Gubry-Rangin *et al*., 2013). En cambio, en la filogenia que emplea el gen *nodA*, la sv. mediterranense (eficiente con plantas de *Phaseolus vulgaris*) se encuentra dentro del mismo clado que las simbiovariedades que nodulan en *Medicago*, lejos de *E. fredii*.

La discrepancia entre las filogenias simbióticas sugiere que, más que transferirse el clúster simbiótico entero, las diferentes simbiovariedades se han formado por la adquisición de un subgrupo de genes de nodulación. Bien la transferencia de un único gen de nodulación o bien la transferencia de clústeres simbióticos enteros, seguidos de la pérdida de varios genes transferidos, en beneficio de otros presentes en la cepa receptora, podrían explicar la emergencia de diferentes simbiovariedades en *E. meliloti*. Reforzando este punto de vista, se ha demostrado que la modificación de un único locus puede controlar un cambio drástico en la especificidad simbiótica, como es el caso de la especificidad de *E. meliloti* sv. medicaginis por *M. laciniata*, que depende del polimorfismo de un único gen, *nodC* (Barran *et al*., 2002).

La idea de un puzle de alelos (de las cepas donadoras y receptoras) también apoya la filogenia según *nifH*. La nitrogenasa es codificada por un grupo de genes que están localizados junto a los genes de nodulación. Sin embargo, la transferencia lateral de genes de nodulación podría no implicar a los genes de fijación de N_2, especialmente cuando estos genes están ya presentes en las cepas receptoras y podrían entonces estar ya adaptados a su fondo genético. La filogenia obtenida con *nifH* sigue esta idea y muestra una topología diferente de la de los genes de nodulación. Por ejemplo, las estirpes de la sv. ciceri que se agrupaban con *E. fredii* y las otras simbiovariedades en el árbol de *nodC*, se encuentra dentro del clado principal de *E. meliloti* en la filogenia con *nifH* (Gubry-Rangin *et al*., 2013).

6. Tipos de estrés que afectan a la simbiosis

El proceso de la fijación simbiótica del N_2 está fuertemente influido por el estado fisiológico de la planta hospedadora. Por ello, una cepa de rizobio persistente y competitiva no desarrolla su capacidad real de fijación de N_2 si existen factores limitantes como, por ejemplo, salinidad, pH desfavorable, deficiencia de nutrientes, toxicidad por minerales, temperaturas extremas, humedad excesiva o deficiente, fotosíntesis insuficiente, enfermedades de la planta o pastoreo, todo lo cual supone limitaciones en el desarrollo de la planta hospedadora (Brockwell *et al*., 1995; People *et al*., 1995; Thies *et al*., 1995). Entre los factores estresantes también se encuentra la presencia de los metales pesados y biocidas (Walsh, 1995). Un estrés concreto puede incluso tener más de un efecto, por ejemplo, la salinidad puede actuar como estrés hídrico, lo cual afecta a la tasa fotosintética y puede afectar directamente al metabolismo del nódulo.

6.1 Estrés salino

La salinidad es un serio problema para la agricultura en las regiones áridas o semiáridas (Rao y Sharma, 1995). Casi el 40% de la superficie terrestre se puede calificar como potencialmente salina (Cordovilla *et al*., 1994) y la mayoría de estas áreas están confinadas en los trópicos y en las regiones Mediterráneas. El aumento de la salinidad da lugar a una disminución de la productividad del cultivo y ocasiona grandes cambios en el patrón de crecimiento de las plantas (Cordovilla *et al*., 1994). Además, el incremento de la concentración de sal puede tener un efecto perjudicial sobre las poblaciones microbianas del suelo como resultado de la toxicidad directa, así como por el estrés osmótico (Tate, 1995). La infertilidad del suelo en las zonas áridas se debe, a veces, a la presencia de grandes cantidades de sal y la introducción de plantas capaces de vivir en estas condiciones (plantas tolerantes a la sal) está siendo investigada para atenuar el problema (fitorremedicación).

La tolerancia a la sal en las plantas es un fenómeno complejo que implica cambios morfológicos y de desarrollo, así como fisiológicos y bioquímicos. Por otro lado, existe variabilidad en la tolerancia a la sal entre las diferentes leguminosas (Zahran, 1991 a y b). Algunas leguminosas, como por ejemplo, *Vicia faba*, *Phaseolus. vulgaris* y *Glycine max*, son más tolerantes a la sal que otras, como *P. sativum*, *Prosopis* (Fagg y Stewart, 1994) y

M. sativa (Abdel-Wahab y Zahran, 1983). Las plantas tolerantes a la sal lo son en menor medida que sus correspondientes rizobios ya que, normalmente, la simbiosis y la formación del nódulo son más sensibles a la sal o al estrés osmótico que el rizobio en sí (El-Shinnawi *et al*., 1989; Velagaleti *et al*., 1990; Zahran, 1991 b; Zahran y Sprent, 1986). Se sabe que la sal inhibe tanto los pasos iniciales de la simbiosis (el desarrollo de los pelos radicales, la colonización bacteriana y la curvatura del pelo radical) como la posterior fijación de N_2 atribuyéndose esto último, normalmente, a la reducción de la respiración en los nódulos (Delgado *et al*., 1994; Ikeda *et al*., 1992; Walsh, 1995), y a una disminución de la producción de proteínas en el citosol, específicamente, leghemoglobina (Delgado *et al*., 1993 y 1994). Aunque, también puede deberse a la distorsión de la estructura del nódulo (Sprent y Zahran, 1988; Zahran, 1986; Zahran y Abu-Gharbia, 1995) y a la reducción de la tasa fotosintética (Georgiev y Atkias, 1993). Todo esto implica que se vea afectado el peso seco y el contenido en nitrógeno en la parte aérea (Cordovilla *et al*., 1995).

Bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* son más tolerantes a la sal que su leguminosa hospedadora, aunque presentan una marcada variación en dicha tolerancia. El crecimiento de algunos rizobios se ve inhibido por una concentración de NaCl de 100 mM (Yelton *et al*., 1983), mientras que otros rizobios como *E. meliloti* son tolerantes a concentraciones entre 300 y 700 mM de NaCl (Embalomatis *et al*., 1994; Helemish *et al*., 1991; Mohammad *et al*., 1991; Sauvage *et al*., 1983) y *R. leguminosarum* se ha visto que es tolerante a concentraciones de NaCl de más de 350 mM (Abdel-Wahab y Zahran, 1979; Breedveld *et al*., 1991).

Muchas especies de bacterias se adaptan a las condiciones de salinidad por la acumulación intracelular de solutos orgánicos de bajo peso molecular llamados osmolitos (Csonka y Hanson, 1991). La función de éstos es contrarrestar el efecto de deshidratación de la baja actividad del agua en el medio, sin interferir con la estructura macromolecular o la función (Smith *et al*., 1994 a). Los rizobios utilizan este sistema de adaptación osmótica (Smith *et al*., 1994 a y b; Zahran *et al*., 1997), acumulando moléculas como: glutamato (Botsford y Lewis, 1990; Jian *et al*., 1993; LeRudulier y Bernard, 1986), trehalosa (El-Sheikh y Wood, 1990; Hoelzle y Streeter, 1990), sacarosa, ectoína (Graham,

1992) y glicina-betaína (LeRudulier y Bernard, 1986; Sauvage *et al*., 1983; Smith *et al*., 1988). Las poliaminas pueden funcionar para mantener el pH intracelular y reparar el desbalance iónico causado por estrés osmótico, además este estrés resulta en la formación de proteínas específicas en bacterias, como las proteínas de choque osmótico que se han encontrado en células de rizobio.

6.2 Estrés por pH

La acidez del suelo también es un problema significativo de cara a la producción agrícola en muchas áreas del mundo y limita la producción de las leguminosas. (Botsford, 1990; Clarke *et al*., 1993; Correa y Barneix, 1997; Graham, 1992). La mayoría de las leguminosas requieren suelos neutros o ligeramente ácidos, especialmente si dependen de la fijación biológica de N_2 (Bordeleau y Prevost, 1994; Brockwell *et al*., 1991). Tanto las leguminosas, como sus rizobios exhiben respuestas variadas a la acidez: algunas especies, como la alfalfa, son extremadamente sensibles, mientras que otras, como *Lotus tenuis*, toleran pH relativamente bajos (Correa y Barneix, 1997). La acidez del suelo detiene la fijación simbiótica del N_2 en suelos tropicales y templados, limitando la supervivencia de los rizobios y reduciendo la nodulación (Brockwell *et al*., 1991; Graham *et al*., 1982; Ibekwe *et al*., 1997). Se han identificado rizobios con alta tolerancia a la acidez (Graham *et al*., 1982), estas cepas normalmente actúan mejor en suelos ácidos en el campo, aunque no siempre es así (Graham *et al*., 1994), *E. meliloti* es muy sensible al estrés por acidez (Brockwell *et al*., 1991, Tiwari *et al*., 1992), sin embargo, *E. medicae* WSM 419 ha mostrado crecer satisfactoriamente en el campo en suelos ácidos (pH 5,0 a 5,5); de todos modos, cepas diferentes de una misma especie varían mucho en su capacidad de tolerancia al pH. Aarons y Graham (1991) encontraron altos niveles de potasio y glutamato en células sometidas a estrés por acidez de R. *leguminosarum* bv. phaseoli, una respuesta que es similar a la encontrada en células con estrés osmótico. Diferencias en la composición del LPS, exclusión y exportación de protones (Chen *et al*., 1993 a y b), acumulación de poliaminas celulares (Fujihara y Yoneyama, 1993) y síntesis de proteínas de choque ácido (Hickey y Hirshfield, 1990) se han asociado con el crecimiento de células a pH ácido; por otro lado, la composición y la estructura de la membrana externa puede ser también un factor de tolerancia a pH (Graham *et al*., 1994).

Una de las causas por las que la nodulación falla bajo condiciones de acidez, especialmente en suelos con pH por debajo de 5, es la incapacidad de algunos rizobios para subsistir en estas condiciones (Bayoumi *et al*., 1995; Carter *et al*., 1994, Graham *et al*., 1982), pero si los rizobios son viables se puede producir una nodulación pobre (Graham, 1992; Graham *et al*., 1994). Las leguminosas hospedadoras parecen ser el otro factor limitante en el establecimiento de la simbiosis bajo condiciones de acidez, difiriendo mucho, además, en su resistencia al pH bajo si tenemos en cuenta el crecimiento y la nodulación (Tang y Thomson, 1996). Se ha visto que la cantidad de N_2 fijado por leguminosas forrajeras en suelos ácidos poco fértiles, es dependiente del crecimiento y la persistencia de las leguminosas (Thomas *et al*., 1997); sin embargo, la selección de rizobios tolerantes al pH bajo para inocular leguminosas en condiciones de acidez garantiza el establecimiento de la simbiosis y también el éxito de la misma (Correa y Barneix, 1997; Glenn y Dilworth, 1994; O'Hara y Glenn, 1994).

Se han adoptado dos estrategias para solventar el problema de la acidez en el suelo: seleccionar plantas tolerantes y encalar el suelo ácido para aminorar los efectos de la acidez. El encalado se hace a tasas de 2500 kg/Ha y en caso de añadir superfosfatos estos se añaden en cantidades de 20 kg/Ha de suelo (Peoples *et al*., 1995). La mejora aumenta el pH del suelo disminuyendo la concentración de aluminio y manganeso disponibles y mejora el crecimiento de la planta y la fijación de N_2.

Los rizobios parecen ser más tolerantes a la alcalinidad que sus leguminosas hospedadoras. Se ha visto que el número de células de *R. leguminosarum* sv. trifolii es mayor en suelos tratados con carbonatos (Evans *et al*., 1988); aumentando el pH del suelo se incrementa tanto la tasa de colonización del suelo como la frecuencia de formación de nódulos.

6.3 Estrés por metales

A nivel biológico, los metales son componentes esenciales en el funcionamiento de procesos celulares básicos en bacterias, animales y plantas. Mientras que bajas concentraciones de algunos metales de transición como cobalto, cobre, níquel o cinc son importantes para muchos procesos biológicos en bacterias, altas concentraciones de estos metales son frecuentemente citotóxicos. Otros metales pesados como cadmio,

cromo, plata o mercurio no tienen beneficios conocidos sobre las bacterias y son tóxicos, algunos de ellos incluso a muy bajas concentraciones (Nies, 2004). Se estima que aproximadamente un tercio de las proteínas requieren algún metal para su correcto plegado y funcionamiento (Tottey *et al.*, 2007). En las bacterias podemos encontrar metales en los centros activos de numerosas enzimas involucradas en distintos procesos celulares indispensables para la bacteria (Mulrooney y Hausinger, 2003).

En el establecimiento y desarrollo de la relación simbiótica rizobio-leguminosa es imprescindible la disponibilidad de metales, debido a que en este proceso hay implicadas metaloproteínas esenciales para un correcto funcionamiento. Algunos de los ejemplos más importantes son: la nitrogenasa, que tiene cofactores metálicos de hierro y molibdeno (Miller *et al*., 1993), la hidrogenasa, que necesita hierro y níquel en el centro activo para llevar a cabo correctamente su función (Palacios *et al.*, 2005) o la leghemoglobina, que contiene átomos de hierro (Brear *et al*., 2013). Por todo esto, la presencia de metales en el medio es esencial para el correcto funcionamiento de la simbiosis.

Por otra parte, un exceso de metales en el interior celular puede producir graves consecuencias para las bacterias, como la intoxicación que se produce debido a la alteración de los procesos celulares básicos. La toxicidad se debe al desplazamiento de metales esenciales de sus sitios nativos de unión y a las interacciones inespecíficas por modificación en la estructura conformacional de ácidos nucleicos y proteínas que producen graves alteraciones de los procesos celulares (Poole y Gadd, 1989). En *E. meliloti* una elevada concentración de cobre intracelular produce deformación y agregación de las células, así como la precipitación del mismo en la superficie celular (Fan *et al.*, 2011). En *Escherichia coli*, el cobre en forma libre en el interior celular produce daños en la membrana plasmática en comparación con el cobre quelado por EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (Selvaraj *et al.*, 2009).

Las bacterias tienen distintos mecanismos para proteger los componentes celulares sensibles a los metales, entre los más conocidos y representados se encuentran: (i) Alteración de la permeabilidad de la membrana con objeto de excluir el metal del interior celular (Zhang y Min, 2010).

(ii) Secuestro de metales en el citoplasma (Klaassen *et al.*, 1999).

(iii) Precipitación del metal en forma de sales insolubles para reducir su biodisponibilidad (Aiking *et al.*, 1982).

(iv) Modificación enzimática hacia formas menos tóxicas del metal (Misra, 1992).

(v) Transporte activo de metales desde el interior celular mediante sistemas de exportación de metales de mayor o menor especificidad (Nies, 2003).

Sin embargo, el correcto funcionamiento de las bacterias requiere un equilibrio entre la entrada y la salida de metales, es decir, una homeostasis a nivel intracelular

7. Sistemas de incorporación de metales a bacterias

En las bacterias existen varias familias de proteínas para la captación de metales: transportadores TBDT (dependientes de TonB), transportadores ABC y permeasas de alta afinidad, como las de las familias HupE/UreJ o NicoT. Los transportadores TBDT transportan el metal desde el medio extracelular al periplasma, a diferencia de las otras dos familias que lo hacen desde el periplasma al citoplasma. Excepto en el caso de los transportadores dependientes de TonB, en las bacterias Gram negativas, los metales pasan a través de la membrana mediante porinas, trímeros localizados en la membrana y que pueden llevar a cabo el transporte de sustancias de bajo peso molecular (Galdiero *et al.*, 2012) (Figura 9).

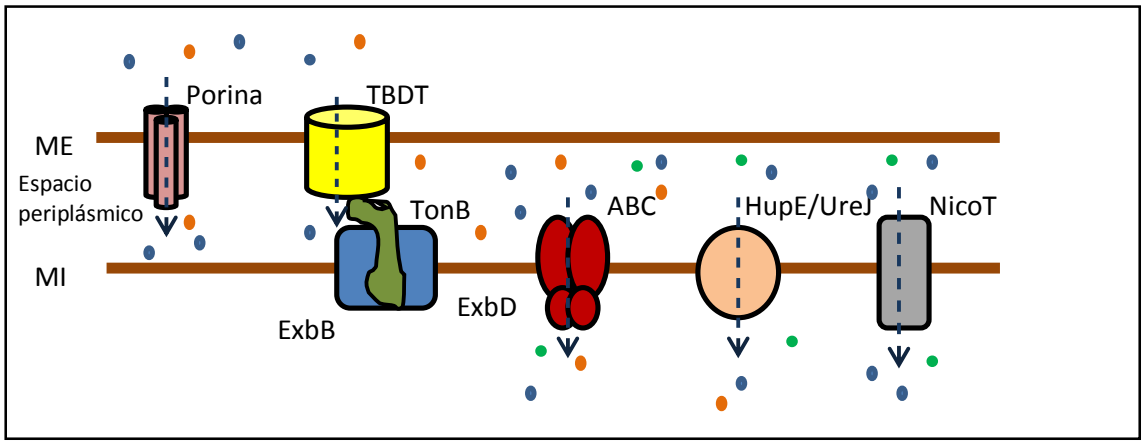


Figura 9. Sistemas de entrada de metal en bacterias. ME: membrana externa, MI: membrana interna, TBDT: transportadores dependientes de TonB, ABC: ATP-binding-cassette, NiCoT: permeasa de níquel y cobalto, HupE/UreJ: permeasas de alta afinidad. (Figura adaptada de Rubio-Sanz, 2014).

7.1 Transportadores TBDT

Los transportadores dependientes de TonB (Figura 9), específicos de bacterias Gram negativas, son proteínas de membrana externa dependientes del sistema TonB-ExbB-ExbD y están involucrados en el transporte de metales unidos a distintos tipos de metalóforos (Noinaj *et al.,* 2010). También están implicados en el transporte de otras sustancias como vitamina B12, complejos de níquel, carbohidratos, compuestos aromáticos (Miller *et al.,* 2010) y otras macromoléculas como alginatos y N-acetil-quitín-oligosacáridos (Boulanger *et al.,* 2010). Este sistema de transporte requiere energía procedente de la fuerza protón-motriz y ésta es transducida a través del complejo ExbBD/TonB desde la membrana plasmática.

7.2 Transportadores ABC

Los transportadores ABC pertenecen a una de las familias proteicas más grandes. Existen transportadores de entrada y de salida, no sólo de metales sino también de un amplio rango de sustratos: mono y oligosacáridos, iones orgánicos e inorgánicos, péptidos, sideróforos, vitaminas y metales, entre otros (Davidson *et al.,* 2008). Estos transportadores están formados al menos por dos dominios de unión a ATP para la transducción de la energía y dos dominios de membrana que forman un canal en la membrana plasmática (Klein y Lewinson, 2011). En el caso de los transportadores ABC de entrada de sustratos, la mayoría tienen una proteína periplásmica de alta afinidad de unión al sustrato (Imperial *et al.*, 1998).

7.3 Permeasas de alta afinidad

Estas permeasas son transportadores secundarios dependientes de la fuerza protón-motriz y están formadas por proteínas individuales con varios dominios transmembrana que pueden formar dímeros o presentarse como monómeros. Las permeasas de la familia HupE/UreJ, ampliamente distribuidas en bacterias y arqueas, se han descrito como transportadores secundarios de níquel. Algunos de los sistemas están codificados dentro de agrupaciones génicas necesarias para la biosíntesis de las enzimas hidrogenasa (HupE) y ureasa (UreJ) (Zhang *et al.,* 2009).

Por otro lado, las permeasas de la familia NiCoT, transportadores de alta afinidad de níquel y cobalto, tienen entre 7 y 8 dominios transmembrana que se localizan en la membrana interna y su tamaño oscila entre 300 - 400 aminoácidos. La energía para el transporte sale de la fuerza protón-motriz y es una familia muy sensible al sustrato ya que son capaces de adquirir el metal en el rango de nanomolar (Eitinger y Mandrand-Berthelot, 2000).

8. Sistemas de resistencia a metales en bacterias

Es necesario mantener el equilibrio homeostático de metales de transición en el interior celular ya que niveles elevados de éstos afectan el correcto desarrollo de las bacterias. Entre los mecanismos de resistencia a metales, los sistemas de expulsión son los más frecuentes; éstos incluyen las ATPasa de tipo P_{IB}, la familia de proteínas RND especializadas en el eflujo de metales pesados, los sistemas HME-RND (Heavy Metal Efflux) y las proteínas facilitadoras de la difusión de cationes (CDF) del inglés Cation Diffusion Facilitator (Nies, 2003). Los sistemas de eflujo de cinc y cadmio mejor caracterizados incluyen:

(i) Las ATPasa de tipo P_{IB} como CadA y ZntA (que determinan resistencia a cadmio, cinc y plomo) identificadas en *Staphylococcus aureus* (Nucifora *et al*., 1989) y *Escherichia coli* (Rensing *et al*., 1997), respectivamente.

(ii) El sistema HME-RND CzcCBA (resistencia a cobalto, níquel, cinc y cadmio) del pMOL30 de *Cupriavidus metallidurans* CH34 (Diels *et al*., 1995) y CzrCBA (resistencia a cadmio y cinc) de *Pseudomonas aeruginosa* (Hassan *et al*., 1999).

(iii) El CDF CzcD (resistencia a cinc, cobalto, cadmio) descrito en *C. metallidurans* CH34 (Anton *et al*., 1999) y el específico de cinc CDF ZitB de *E.coli* (Grass *et al*., 2001).

En la Figura 10 se encuentran representados los principales sistemas de expulsión de metales, atendiendo al lugar que ocupan en las membranas.

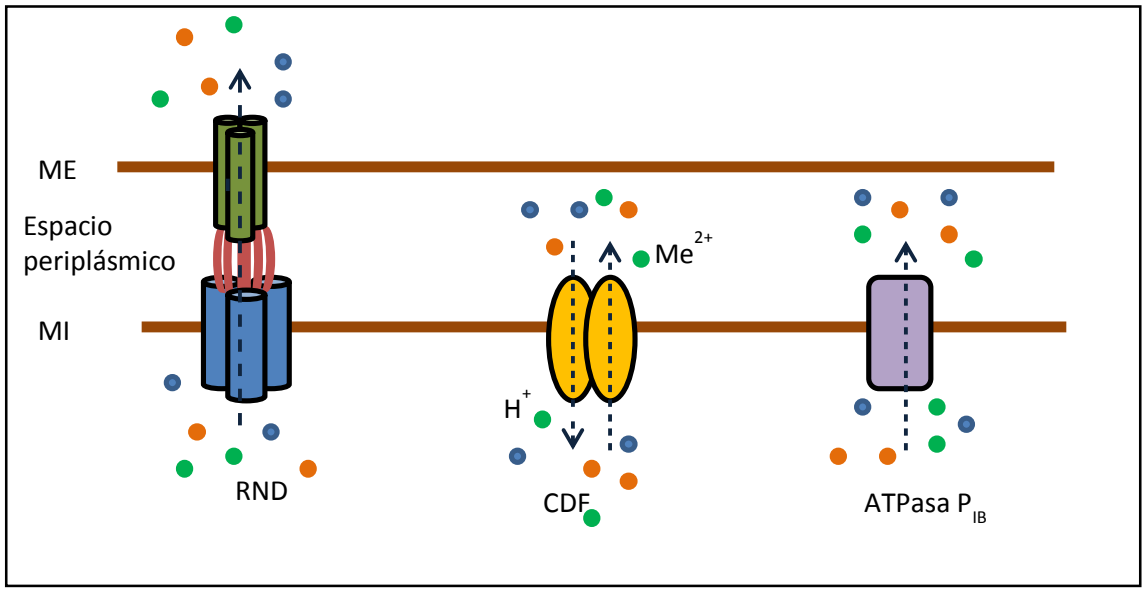


Figura 10. Principales sistemas de salida de cationes metálicos en bacterias Gram negativas. ME: membrana externa, MI: membrana interna, RND: Resistance-Nodulation-cell Division, CDF: Cation Diffusion Facilitator protein, ATPasa P_{IB}: ATPasas de tipo P1B. Las flechas indican las posibles direcciones de transporte de cationes metálicos (Figura adaptada de Rubio-Sanz, 2014).

8.1 ATPasa de tipo P_{IB}

Los transportadores ATPasas de tipo P_{IB} pertenecen a la gran superfamilia de bombas de ATP, implicadas en el transporte de metales a través de las membranas celulares en contra de su gradiente de concentración, para mantener niveles constantes y no tóxicos de metales dentro del citoplasma. Se agrupan en cuatro subgrupos de acuerdo al metal al que se unen y a especificidades en el transporte (Argüello, 2003): P_{IB-1} o Cu^+/Ag^+-ATPasas, P_{IB-2} o Zn^{2+}/Cd^{2+}-ATPasas, P_{IB-3} o $Cu^+/Ag^+/Cu^{2+}$-ATPasas y P_{IB-4} o Co^{2+}-ATPasas.

Las ATPasas de tipo P_{IB} tienen características estructurales que las diferencian de sus homólogas ATPasas de tipo P como:

(i) Una disposición topológica de 6 a 8 dominios transmembrana (TM) flanqueando un gran lazo citoplasmático.

(ii) Varios dominios citoplasmáticos reguladores de la unión a metales localizados en la región amino terminal (N-MBD, metal binding domain) que son responsables del reconocimiento de los metales, regulación y movimientos a través de la barrera permeable de la membrana (Argüello, 2003; Bal *et al*., 2001; Mana-Capelli *et al*., 2003).

(iii) Una secuencia fija en el sexto TM conteniendo un motivo CPX (cisteína, prolina y siendo X ¼ de cisteína, histidina o serina), un motivo SPC (serina, prolina, cisteína) o TPC (treonina, prolina, cisteína) corriente abajo del largo lazo citoplasmático que podría ser parte del canal de cationes (Argüello *et al*., 2003; Argüello *et al*., 2007; Mandal y Argüello, 2003).

Recientemente *cadA* ha sido descrito como el primer gen de detoxificación implicado en la defensa contra cadmio y cinc en *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683^{T}, confiriendo a la bacteria, gran capacidad para duplicarse con altas concentraciones de cinc (Maynaud *et al*., 2014). CadA tiene un importante papel en la defensa frente al estrés por cadmio y cinc (Rossbach *et al*., 2008) y muestra una gran identidad con otras ATPasa de tipo P_{IB} de rizobios, como la de *Mesorhizobium* sp. STM 4661 (Maynaud *et al*., 2013) y la ATPasa de tipo P_{IB} (SMc04128) encontrada en *E. meliloti* con un 63% de identidad.

8.2 Familia de proteínas facilitadoras de la difusión de cationes (CDF)

Las proteínas CDF forman una familia de transportadores de metales (Saier, 2000) presentes en los tres dominios de la vida (Paulsen y Saier, 1997). Los sustratos primarios de las proteínas CDF son Zn^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cd^{2+} y Fe^{2+}. El transporte mediado por CDF se impulsa por un gradiente de concentración, un gradiente osmótico, potencial hídrico, potencial de pH o un gradiente de potasio (Guffanti *et al*., 2002; Blos *et al*., 2002). Todas las proteínas CDF descritas están implicadas en la resistencia a Zn^{2+} y otros cationes de metales pesados.

El arquetipo de la familia es CzcD de *C. metallidurans* CH34, que fue el primero descrito como un regulador de la expresión del sistema de resistencia CzcCBA (Nies, 1992), pero CzcD es capaz también de llevar a cabo resistencia a pequeñas cantidades de Zn^{2+}/Co^{2+}/Cd^{2+} (Guffanti *et al*., 2002) en ausencia del sistema de resistencia más importante, CzcCBA (Anton *et al*., 1999). La presencia de CzcD disminuye la concentración citoplásmica de estos metales (Anton *et al*., 1999), los cuales sirven como inductores de la expresión de *czc* (Groβe *et al*., 2004).

Sistemas pertenecientes a esta familia se han descrito también en otras especies como *Bacillus subtilis,* (Sturr *et al*., 1997); *S. aureus,* (Wang *et al*., 2000); *Thermus thermophilus*, (Spada *et al*., 2002) y *E.coli,* (Grass *et al*., 2001).

8.3 Familia de proteínas RND

La familia de proteínas RND se describió como un grupo de proteínas bacterianas de transporte implicadas en la resistencia a metales pesados (*C. metallidurans*), nodulación (*M. loti*) y división celular (*E. coli*) (Saier *et al*., 1994). Ésta se ha convertido en una gran superfamilia que incluye a su vez siete familias y que se pueden encontrar en todos los reinos de la vida (Tseng *et al*., 1999). En bacterias y arqueas, miembros de esta superfamilia están implicados en el transporte de metales pesados, compuestos hidrofóbicos, factores de nodulación y junto con SecDF, en la exportación de proteínas. Miembros de la superfamilia RND en eucariotas transportan esteroles o sirven como receptores.

Las proteínas involucradas en el transporte y en la exportación compuestos hidrofóbicos se conoce como HAE-RND (Hydrophobe/Amphiphile Efflux), mientras que la familia que se encarga del transporte de metales pesados recibe el nombre de HME-RND. A su vez, la familia HME se puede subdividir en cinco grupos: HME1, que transporta Zn^{2+}, Co^{2+} y Cd^{2+}; HME2, Co^{2+} y Ni^{2+}; HME3a, metales divalentes y HME3b metales monovalentes, HME4, Cu^{+} y Ag^{+} y HME5, Ni^{2+} (Nies, 2003).

Los sistemas RND utilizan la fuerza protón-motriz para transportar el sustrato al exterior de la célula (Álvarez-Ortega *et al.,* 2013). Cerca de un gen que codifica una proteína RND está, en la mayoría de los casos, un segundo gen que codifica un miembro de la familia de proteínas de fusión de membranas (Membrane Fusion Protein, MFP) (Saier *et al*., 1994). Esta familia también se conoce como familia de proteínas de eflujo periplásmico (Johnson y Church, 1999) o, más recientemente, como proteínas periplásmicas adaptadoras (Andersen *et al*., 2001). Junto a las MFP, muchas proteínas RND actúan con una tercera proteína que pertenece a la familia de factores de membrana externa (OMF, Outer Membrane Factor) (Johnson y Church, 1999; Paulsen *et al*., 1997). Estas tres proteínas forman un complejo proteico que puede transportar sus sustratos

desde el citoplasma, la membrana citoplasmática o el periplasma, a través de la membrana externa, directamente fuera (Zgurskaya y Nikaido, 2000 a y b) (Figura 11).

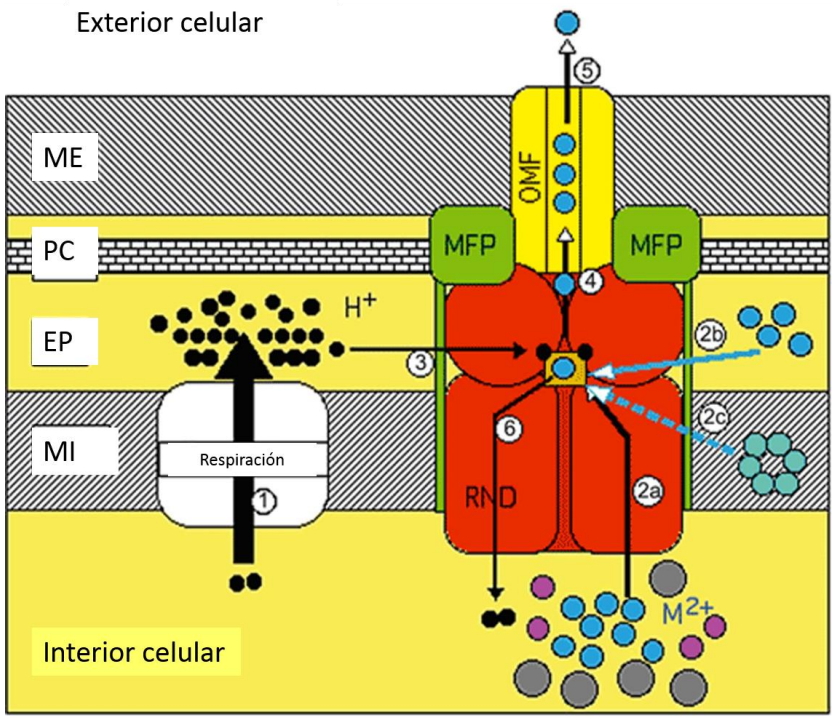


Figura 11. Mecanismo y función celular de las proteínas RND. La proteína RND (rojo) se muestra como un trímero con un sitio periplásmico de unión al sustrato. La MFP (verde) y la OMF (amarillo). Las proteínas RND llevan a cabo su función por protones (puntos negros) que, previamente, son expulsados por la cadena respiratoria (1). En el caso de las proteínas HME1 y HME2, los cationes de metales pesados divalentes (círculos azules, morados y grises M^{2+}) migran a través del canal de cationes de la proteína y están unidos a una zona periplásmica de unión a sustratos (caja naranja, 2a). Alternativamente (flechas azules) este sitio puede ser accesible también para cationes periplásmicos (2b), especialmente en el caso de proteínas HME4 y Cu^{2+}. Los transportadores de sustratos orgánicos (HAE) pueden unir estos sustratos desde el ambiente hidrofóbico de la membrana (2c). La afinidad del hipotético sitio de unión periplásmico disminuye por la protonación con protones del periplasma (3) y esta energía se usa para acumular sustratos en el tubo OMF o en un microambiente formado por la proteína RND (4). La alta concentración en este tubo permite la difusión fácil de sustratos desde el tubo al exterior (5). Para el acoplamiento energético, el hipotético sitio periplásmico de unión al sustrato se desprotona por el importe de protones al citoplasma (6). Esta compleja reacción permite el transporte de sustratos a través de la envoltura completa de una bacteria Gram negativa, que está compuesta por una membrana externa (OM), pared celular (CW), espacio periplásmico (PP) y membrana citoplasmática (CPM), (Nies, 2003).

El primer miembro identificado de la familia RND fue la proteína CzcA de *C. metallidurans* seguida de la proteína CnrA de la misma bacteria. Esta Betaproteobacteria contiene dos megaplásmidos implicados en la resistencia a metales pesados, pMOL30, que tiene función en la resistencia a cinc, cobalto y cadmio y pMOL28 que media la

resistencia a níquel y cobalto. El plásmido pMOL30 se designó como Czc y se ha descrito que en su región estructural hay genes que codifican una OMF, CzcC; también una MFP, CzcB y la proteína CzcA de la familia RND. Los tres genes forman un operón *czcCBA* (van der Lelie *et al*., 1997) y éste está flanqueado por múltiples genes implicados en la regulación de la expresión de *czcCBA* dependiente de metales, (Groβe *et al*., 1999; Nies, 1992). La resistencia a Co^{2+}, Zn^{2+} y Cd^{2+} mediada por Czc se basa en la disminución intracelular de los tres cationes como resultado de la expulsión (Nies y Silver, 1989), impulsado por la fuerza proton-motriz (Nies, 1995).

La resistencia a cobalto y níquel determinada por *cnr* en el plásmido pMOL28 también se basa en la expulsión de los cationes (Nies y Silver, 1989; Sensfuss y Schlegel, 1988). La resistencia está determinada por la región estructural *cnrCBA* (Liesegang *et al*., 1993) que está precedida por la región génica reguladora *cnrYXH* (Grass *et al*., 2000; Tibazarwa *et al*., 2000). Al igual que en *czcCBA,* en *cnrCBA* se expresa el OMF CnrC, el MFP CnrB y la proteína RND CnrA.

La importancia del sistema CzcCBA es, quizá, que no sólo disminuye la concentración citoplasmática de metales pesados si no que, adicionalmente o exclusivamente, la concentración periplásmica. En este caso, los cationes podrían ser eliminados antes de que pudieran entrar en la célula. Además, el sistema de eflujo de CzcCBA podría mediar la expulsión de cationes que hayan sido extraídos previamente del citoplasma por otros sistemas de eflujo. La velocidad de eflujo del complejo CzcCBA es lenta cuando las concentraciones citoplasmáticas están por debajo de K_{50}, pero permite una exportación rápida cuando las concentraciones son mayores (Nies, 2003).

Los sistemas RND, también pueden estar implicados en la expulsión de múltiples sustancias toxicas para la bacteria como antibióticos, colorantes, y compuestos antimicrobianos en general, por ello también forman una de las cinco familias en que se dividen los sistemas de resistencia a multidrogas (MDR). Los sistemas MDR, son proteínas de membrana que están implicadas en la expulsión de antimicrobianos y están compuestos por las siguientes familias: la familia RND, la familia MFS (major facilitator superfamily), SMR (small multidrug resistance), la familia ABC y por último la familia MATE (multidrug and toxic compound extrusion). Los sistemas RND cuya función es la expulsión de antimicrobianos también están formados por un conjunto de tres proteínas

ancladas a la membrana, que serían la proteína de membrana interna (RND), la proteína de membrana externa (OMF) y la proteína de fusión a la membrana (MFP) que une las dos anteriores.

8.3.1 El operón *nodM-nolFG-nodN*

El gen *nolG* (SMa0875) de *E. meliloti* forma parte de un operón constituido por 4 genes *nodM-nolFG-nodN* cuya expresión se activa en respuesta a luteolina (Baev *et al*., 1991). Además, se ha descrito que este operón en *E. meliloti* es necesario para una nodulación óptima en alfalfa (Baev *et al*., 1991), pero no es la única especie en que está presente, ya que dos de los genes, *nodM* y *nodN*, están conservados en *R. leguminosarum* sv. viciae (Surin y Downie, 1988), y una copia del gen *nolG* ha sido descrita posteriormente en *Rhizobium tropici* PRF81, (Pinto *et al*., 2009).

La comparación de las secuencias de ADN y aminoácidos de este operón con el ADN y las proteínas de las bases de datos revelaron homologías significativas entre *nodM* y los genes *glmS* (Walker *et al*., 1984) y *pufF* (Yso *et al*., 1982) de *E. coli*, *purF* de *B. subtilis* (Vollmer *et al*., 1983) y el gen *ade4* de *Saccharomyces cerevisiae* (Maentsaelae y Zalkin, 1984). La prueba más fehaciente fue encontrar que el gen *glmS* de *E. coli* tiene un 48,2% de homología a nivel de aminoácidos.

La homología y la relación funcional entre *nodM* y *glmS* de *E. coli* sugirió la pregunta del papel de la proteína *nodM* en el proceso simbiótico. Teniendo en cuenta que la inactivación de *nodM* no resulta en la pérdida de viabilidad de las células en vida libre, es obvio que *nodM* no es un gen primario como *glmS* que codifique una glucosamina sintetasa como una enzima *housekeeping*, porque su inactivación debería ser letal. Además, *nodM* se activa por las señales de las plantas y es encargada de proporcionar suficiente glucosamina para la síntesis del esqueleto oligosacarídico del factor de nodulación (Baev *et al*., 1991), lo que hace que sea un gen firmemente ligado a los primeros pasos del proceso de nodulación en *Medicago*.

Diversos estudios mostraron a este gen como una glucosamina sintetasa debido a:

(i) Su gran homología con la glucosamina sintetasa de *E. coli* (*gmlS*).

(ii) La complementación de un mutante *gmlS* de *E. coli* se llevó a cabo por el gen *nodM*.
(iii)Los mutantes *nodM* sufren un retraso en la nodulación de la alfalfa, efecto que se suprime por la adición de glucosamina exógena.

El gen *nodM* se requiere sólo para ciertas plantas hospedadoras: en *E. meliloti* es importante para la nodulación en *Medicago* y en *R. leguminosarum* sv. viciae para la nodulacion en *Vicia*. Una explicación para la especificidad observada con el hospedador podría ser que mientras que *nodM* y/o el producto de otros genes aportan glucosamina en cantidades suficientemente grandes a las proteínas Nod comunes para sintetizar molécula señal, en los mutantes la menor cantidad de sustrato da lugar a una cantidad reducida de factores Nod, los cuales son suficientes para *Melilotus* pero no para *Medicago* (Baev *et al*., 1991). Por ello, los mutantes *nodM* indujeron nódulos que no sólo se retrasaron en el desarrollo, si no que eran menos eficientes en la fijación de N_2 (Baev *et al*., 1991).

La función de la proteína NodN, codificada por el último gen del operón, aún no ha sido caracterizada, aunque su secuencia de aminoácidos revela la presencia de un dominio conservado en proteínas bacterianas con actividad hidratasa sobre enoil-CoA específicos.

El análisis *in silico* de *nolFG* sugiere que estos genes codifican una bomba MDR del tipo RND, donde NolG constituye el transportador de membrana interna y NolF la MFP que conecta el transportador con el tercer componente del sistema, una proteína localizada en la membrana externa u OMF codificada por un gen que no está ligado a *nolFG*. La función durante la simbiosis de la bomba codificada por los genes *nolFG* no está clara, así como tampoco están establecidos los sustratos que transporta.
La bomba NolFG de tipo RND se pensaba que estaba involucrada en la nodulación, debido a los resultados obtenido por Baev *et al*. (1991) en mutantes derivados de la cepa AK631 de *E. meliloti*. Ellos exponen que la inserción de Tn5 en cualquiera de estos genes supone un retraso en la nodulación y una reducción del número de nódulos en alfalfa. En un estudio más extenso, este grupo sugirió que la inserción de Tn5 en los genes *nolFG* no disminuye los niveles de transcripción del gen corriente abajo, *nodN*, el cual codifica una proteína necesaria para la producción eficiente de factores Nod (Baev *et al*., 1992).

Más recientemente, la mutación por deleción sin marcador realizada, en el gen *nolG*, por Eda *et al.* (2011), no mostró ninguna alteración del fenotipo simbiótico, por ello según estos autores, es muy probable que las mutaciones causadas por Tn5 en los genes *NolFG* ocasionaran un efecto polar corriente abajo sobre la expresión del gen *nodN* y que éste fuera el causante del fenotipo en la nodulación.

9. Lugares de estudio: Paraje Natural Marismas del Odiel y Paisaje Protegido de Río Tinto

El sistema de estuarios de los ríos Tinto y Odiel, tiene un gran significado histórico, así como interés ambiental al ser uno de los sistemas de estuarios fluviales más contaminados en el mundo. Es en las cabeceras de estos ríos donde se produjeron los aportes mineros en las Edades de Cobre y Bronce. Más recientemente, entre los años 1960 y 1985, la ciudad de Huelva llegó a ser enclave de una de las industrias más contaminantes, de modo que la contaminación inicial se vio incrementada con los residuos ácidos derivados de las dos zonas industriales localizadas cerca de la desembocadura, productos fertilizantes, derivados secundarios del petróleo y químicos. Aunque es posible que la contaminación del sistema comenzara hace miles de años con el origen de la minería y de los depósitos masivos de sulfuros cerca de la cabecera del Río Tinto (Davis *et al*., 2000), algunos productos, como por ejemplo los yesos, se acumulan en el margen fluvial con erosión parcial durante los meses de lluvias y los flujos de la marea. Estos desechos contienen altos niveles de sulfuros asociados a los metales pesados, principalmente cobre, plomo y cinc, aunque también contienen hierro, arsénico, plata y oro, por lo que estas industrias han contribuido en gran medida a la contaminación de los estuarios locales. Por último, una tercera fuente de metales pesados para la zona del estuario, son las aguas residuales de la ciudad de Huelva (Ruiz, 2001).

9.1 Paraje Natural Marismas del Odiel

Situado al sur de la provincia de Huelva, en la confluencia de las desembocaduras de los ríos Tinto y Odiel, el encuentro entre las aguas dulces y saladas, ha dado lugar a un complejo de marismas influenciadas por las mareas, conocido como Marismas del Odiel. El sistema funciona como un estuario donde los cauces de ambos ríos depositan al desembocar gran cantidad de sedimentos cargados de nutrientes y

metales pesados. A su vez, este aporte continuo de sedimentos y las fuerzas de las mareas, generan islas separadas por extensos brazos de agua, como la Isla de En medio, la de Saltés y la de Bacuta, localizadas al sur del enclave. Este medio salino, determina el predominio de especies vegetales resistentes a altas concentraciones de sal, así como la presencia de una microbiota en el suelo capaz de vivir en estas condiciones.

Parte de su riqueza ecológica estriba en la variedad de paisajes que conforman este enclave. Desde marismas mareales, a lagunas como la de Batán y la del Taraje, pasando por la playa del Espigón o los bosques de El Almendral, El Acebuchal y La Cascajera (http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/servtc5/ventana/mostrarFicha.do;jsessionid=3C7E543EC4AFBA0E135C8D55753C8A52?idEspacio=7393)

9.2 Paisaje Protegido de Río Tinto

El Paisaje Protegido de Río Tinto abarca los tramos alto y medio del Río Tinto siendo un lugar único, tanto por su belleza cromática como por sus excepcionales condiciones ambientales e históricas. Alrededor del curso alto, se sitúa el mayor yacimiento minero a cielo abierto de Europa que fue explotado desde los tartesos y, sobre todo, por los romanos. Toda esta larga actividad ha originado un peculiar paisaje, las tonalidades del río se deben al alto contenido en sales ferruginosas y sulfato férrico que, junto a la escasez de oxígeno, otorgan un pH muy ácido.

Estas aguas acogen una gran diversidad de microorganismos adaptados a hábitats extremos, muchos de ellos aún sin catalogar y en la escasa vegetación de ribera de los márgenes del cauce, dada la acusada acidez del medio, destaca el llamado brezo de las minas, una especie amenazada en peligro de extinción, endémica de Huelva, que acoge y da sustento a una necesaria comunidad animal.

9.3 Plantas leguminosas presentes en las Marismas del Odiel y en Río Tinto. *Medicago marina*

En las Marismas del Odiel y la ribera del Río Tinto, se pueden encontrar una variedad de leguminosas, entre otras plantas adaptadas a las condiciones de la zona. Algunas de las leguminosas presentes son: *Ornithopus compressus*, *Lotus corniculatus*, *Trifolium* sp., *Lathyrus* sp., *Medicago* sp., *Medicago polymorpha* y *Medicago marina.* Sin

embargo, la zona de las minas, debido a sus excepcionales características, solo se encontraron plantas de *Trifolium* sp.

M. marina es una leguminosa perenne, ampliamente distribuida en España, norte de África y la mitad de Asia. Esta planta suele crecer en suelos muy áridos y ácidos, con pH entre 3,5 y 5,5; de hecho, se considera una planta indicadora de acidez y sequedad. En España, crece a lo largo de los sistemas dunares costeros y tiene un importante uso potencial en la recuperación y estabilización de este tipo de ecosistemas.

OBJETIVOS

1. Caracterización de rizobios aislados de nódulos de leguminosas que se desarrollan en suelos sometidos a estrés abiótico del Paraje Natural Marismas del Odiel y del Paisaje Protegido de Río Tinto

2. Estudio fisiológico, molecular y simbiótico de los rizobios aislados de *Medicago marina* de poblaciones del suroeste de Andalucía.

3. Implicación del gen *nolG* en la simbiosis *E. meliloti* y *E. medicae* con *M. sativa* y en la resistencia a metales pesados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales y Métodos relacionados con bacterias

1. 1 Bacterias, plásmidos y agentes selectivos e identificativos

1. 1. 1 Bacterias y plásmidos

Las estirpes bacterianas y plásmidos utilizados en esta Tesis se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1: Bacterias y plásmidos utilizados en esta Tesis.

Estirpes aisladas de Marismas del Odiel y Río Tinto		
ESTIRPE	**CARACTERÍSTICAS RELEVANTES**	**REFERENCIA**
ORT1	Aislada de zona "Recuperada" (Marismas del Odiel), de la planta *Ornithopus compressus*	Esta Tesis
ORT2	Aislada de zona "Recuperada" (Marismas del Odiel), de la planta *O. compressus*	Esta Tesis
ORT3	Aislada de zona "Recuperada" (Marismas del Odiel), de la planta *O. compressus*	Esta Tesis
ORT4	Aislada de zona "Recuperada" (Marismas del Odiel), de la planta *O. compressus*	Esta Tesis
ORT5	Aislada de zona "Recuperada" (Marismas del Odiel), de la planta *O. compressus*	Esta Tesis
ORT6	Aislada de zona "Recuperada" (Marismas del Odiel), de la planta *O. compressus*	Esta Tesis
ORT7	Aislada de zona "Recuperada" (Marismas del Odiel), de la planta *O. compressus*	Esta Tesis
ORT8	Aislada de zona "Recuperada" (Marismas del Odiel), de la planta *O. compressus*	Esta Tesis
ORT9	Aislada de zona "Recuperada" (Marismas del Odiel), de la planta *Lotus corniculatus*	Esta Tesis
ORT10	Aislada de zona "Recuperada" (Marismas del Odiel), de la planta *L. corniculatus*	Esta Tesis
ORT20	Aislada de "Arenal Seco" (Marismas del Odiel), de la planta *Medicago* sp.	Esta Tesis
ORT21	Aislada de "Arenal Seco" (Marismas del Odiel), de la planta *Medicago* sp.	Esta Tesis
ORT22	Aislada de "Arenal Seco" (Marismas del Odiel), de la planta *Medicago* sp.	Esta Tesis
ORT23	Aislada de "Arenal Seco" (Marismas del Odiel), de la planta *Medicago* sp.	Esta Tesis
ORT24	Aislada de "Arenal Seco" (Marismas del Odiel), de la planta *Medicago* sp.	Esta Tesis
ORT25	Aislada de "Arenal Seco" (Marismas del Odiel), de la planta *Medicago* sp.	Esta Tesis

Estirpes aisladas de Marismas del Odiel y Río Tinto		
ESTIRPE	**CARACTERÍSTICAS RELEVANTES**	**REFERENCIA**
ORT26	Aislada de "Arenal Seco" (Marismas del Odiel), de la planta *Medicago* sp.	Esta Tesis
ORT27	Aislada de "Arenal Seco" (Marismas del Odiel), de la planta *Medicago* sp.	Esta Tesis
ORT28	Aislada de "Arenal Seco" (Marismas del Odiel), de la planta *Medicago* sp.	Esta Tesis
ORT29	Aislada de "Minas de Río Tinto", de la planta *Trifolium* sp.	Esta Tesis
ORT31	Aislada de "Minas de Río Tinto", de la planta *Trifolium* sp.	Esta Tesis
ORT32	Aislada de "Minas de Río Tinto", de la planta *Trifolium* sp.	Esta Tesis
ORT33	Aislada de "Minas de Río Tinto", de la planta *Trifolium* sp.	Esta Tesis
ORT35	Aislada de "Minas de Río Tinto", de la planta *Trifolium* sp.	Esta Tesis
ORT38	Aislada de "Minas de Río Tinto", de la planta *Trifolium* sp.	Esta Tesis
ORT39	Aislada de "Minas de Río Tinto", de la planta *Trifolium* sp.	Esta Tesis
ORT40	Aislada de "Minas de Río Tinto", de la planta *Trifolium* sp.	Esta Tesis
ORT41	Aislada de "Minas de Río Tinto", de la planta *Trifolium* sp.	Esta Tesis
ORT42	Aislada de "Minas de Río Tinto", de la planta *Trifolium* sp.	Esta Tesis
ORT43	Aislada de "Minas de Río Tinto", de la planta *Trifolium* sp.	Esta Tesis
ORT44	Aislada de "Minas de Río Tinto", de la planta *Trifolium* sp.	Esta Tesis
ORT45	Aislada de "Minas de Río Tinto", de la planta *Trifolium* sp.	Esta Tesis
ORT46	Aislada de "Minas de Río Tinto", de la planta *Trifolium* sp.	Esta Tesis
ORT47	Aislada de "Ribera de Río Tinto", de la planta *Medicago polymorpha*	Esta Tesis

Ensifer meliloti		
ESTIRPE	**CARACTERÍSTICAS RELEVANTES**	**REFERENCIA**
LMG 6133^T	Estirpe tipo	De Lajudie *et al.*, 1998
ORT11	Aislada del "Arenal Seco" (Marismas del Odiel), de la planta *Medicago marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
ORT12	Aislada del "Arenal Seco" (Marismas del Odiel), de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015

Ensifer meliloti ESTIRPE	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	REFERENCIA
ORT13	Aislada del "Arenal Seco" (Marismas del Odiel), de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
ORT16	Aislada del "Arenal Seco" (Marismas del Odiel), de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
ORT17	Aislada del "Arenal Seco" (Marismas del Odiel), de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
ORT18	Aislada del "Arenal Seco" (Marismas del Odiel), de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
ORT19	Aislada del "Arenal Seco" (Marismas del Odiel), de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SF1.2	Aislada de las Dunas de San Fernando, de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SF1.6	Aislada de las Dunas de San Fernando, de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SF1.11	Aislada de las Dunas de San Fernando, de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SF2.11	Aislada de las Dunas de San Fernando, de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SF2.17	Aislada de las Dunas de San Fernando, de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SF3.1	Aislada de las Dunas de San Fernando, de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SF3.3	Aislada de las Dunas de San Fernando, de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SF3.5	Aislada de las Dunas de San Fernando, de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SF3.9	Aislada de las Dunas de San Fernando, de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SF3.10	Aislada de las Dunas de San Fernando, de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SF3.20	Aislada de las Dunas de San Fernando, de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SF3.21	Aislada de las Dunas de San Fernando, de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SF3.23	Aislada de las Dunas de San Fernando, de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SF3.33	Aislada de las Dunas de San Fernando, de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SF3.34	Aislada de las Dunas de San Fernando, de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SF3.37	Aislada de las Dunas de San Fernando, de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SF3.40	Aislada de las Dunas de San Fernando, de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SF3.42	Aislada de las Dunas de San Fernando, de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015

Ensifer meliloti		
ESTIRPE	**CARACTERÍSTICAS RELEVANTES**	**REFERENCIA**
SF3.48	Aislada de las Dunas de San Fernando, de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SF3.49	Aislada de las Dunas de San Fernando, de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SF3.53	Aislada de las Dunas de San Fernando, de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SF3.55	Aislada de las Dunas de San Fernando, de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
Sm1021	Estirpe de referencia	Meade y Signer, 1977
SVQ747	*E. meliloti* ORT12, Rif 50^R	Esta Tesis
SVQ749	*E. meliloti* SVQ747 mutado en el gen *nolG* por inserción del casete l*acZ*-Gm en el mismo sentido del gen, Rif 50^R, Gm 25^R	Esta Tesis
SVQ761	*E. meliloti* SVQ747 mutado en el gen *nolG* por delecion Rif 50^R	Esta Tesis
SVQ747 (pBBR1MCS-2)	*E. meliloti* SVQ747 que porta el plásmido pBBR1MCS-2, Rif 50^R, Km 60^R	Esta Tesis
SVQ749 (pBBR1MCS-2)	*E. meliloti* SVQ749 que porta el plásmido pBBR1MCS-2, Rif 50^R, Km 60^R, Gm 25^R	Esta Tesis
SVQ749 (pMUS1306)	*E. meliloti* SVQ749 que porta el plásmido pMUS 1306, Rif 50^R, Km 60^R, Gm 25^R	Esta Tesis
SVQ761 (pBBR1MCS-2)	*E. meliloti* SVQ761 que porta el plásmido pBBR1MCS-2, Rif 50^R, Km 60^R	Esta Tesis
SVQ761 (pMUS1306)	*E. meliloti* SVQ761 que porta el plásmido pMUS 1306, Rif 50^R, Km 60^R	Esta Tesis
SVQ747(pGUS3)	*E. meliloti* SVQ747 que porta el plásmido pGUS3, Rif 50^R, Km 200^R	Esta Tesis
Ensifer medicae		
ESTIRPE	**CARACTERÍSTICAS RELEVANTES**	**REFERENCIA**
LMG 19920^T	Estirpe tipo	Rome *et al.*, 1996
M19.1	Estirpe de referencia	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SF3.41	Aislada de las Dunas de San Fernando de la planta *M. marina*	Alías-Villegas *et al.*, 2015
SVQ748	*E. medicae* SF3.41 Rif 50^R	Esta Tesis
SVQ750	*E. medicae* SVQ748 mutado en el gen *nolG* por inserción del casete *lacZ*-Gm en el mismo sentido del gen, Rif 50^R, Gm 50^R	Esta Tesis
SVQ750 pBBR1MCS-2	*E. medicae* SVQ750 que porta el plásmido pBBR1MCS-2, Rif 50^R, Km 30^R	Esta Tesis
SVQ750 (pMUS 1313)	*E. medicae* SVQ750 que porta el plásmido pMUS 1313, Rif 50^R, Km 30^R	Esta Tesis
SVQ748(pGUS3)	*E. medicae* SVQ748 que porta el plásmido pGUS3, Rif 50^R, Km 30^R	Esta Tesis

Escherichia coli		
ESTIRPE	**CARACTERÍSTICAS RELEVANTES**	**REFERENCIA**
DH5α	*SupE44*, Δ*lacU169*, 5hsdR17, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*, Nx^R	Sambrook *et al*., 1989
PLÁSMIDO	**CARACTERÍSTICAS RELEVANTES**	**REFERENCIA**
pAB2001	Plásmido que contiene el casete *lacZ*-Gm^R, Ap^R, Gm^R	Becker *et al*., 1995
pGEM-T Easy	Vector de clonación de productos de PCR, Ap^R	Promega (EEUU)
pK18*mob*	Vector de clonación (suicida en los rizobios), Km^R	Schäfer *et al*., 1994
pK18*mobsacB*	Vector de clonación que contiene el gen de sensibilidad a la sacarosa. Suicida en los rizobios, Km^R	Schäfer *et al*., 1994
pRK2013	Plásmido coadyuvante, Km^R	Figurski y Helinski, 1979
pBBR1MCS-2	Vector de clonación de amplio rango de hospedador, Km^R	Kovach *et al*., 1995
pMP240	Plásmido IncP que porta el promotor del gen *nodA* de *Rhizobium leguminosarum* fusionado al gen *lacZ*, Tc^R	De Maagd *et al*., 1988
pGUS3	Plásmido con la fusión entre el promotor del gen *nfeD* y el gen *gusA* del pIB199, Km^R	García-Rodríguez y Toro, 2000
Construcciones que portan el gen *nolG*		
pMUS1216	Plásmido pGEM-T Easy que porta un fragmento de PCR del gen *nolG* de ~2,5 kb de *E. meliloti* Sm1021, Ap^R	Esta Tesis
pMUS1228	pMUS1216 con el casete *lacZ*-Gm en el sentido del gen, inserto en el punto *Bam*HI situado en el gen *nolG*, Ap^R, Gm^R	Esta Tesis
pMUS1256	Plásmido pK18*mob* que porta la fusión *nolG*::*lacZ*-Gm, inserto en el punto *Sma*I de pK18*mob* Km^R, Gm^R	Esta Tesis
pMUS1306	Plásmido pBBR1MCS-2 que porta el gen *nolG* completo de E. *meliloti* ORT12, Km^R.	Esta Tesis
pMUS1313	Plásmido pBBR1MCS-2 que porta el gen *nolG* completo de *E. medicae* SF3.41, Km^R.	Esta Tesis
pMUS1326	Plásmido pK18*mobsacB* que porta un fragmento *Eco*RI- *Hind*III de ~1 kb que contiene el gen *nolG* delecionado de *E. meliloti* ORT12, Km^R.	Esta Tesis

Ap: ampicilina, Gm: gentamicina, Km: kanamicina, Nx: ácido nalidíxico, Tc: tetraciclina, Rif: rifampicina.

1. 1. 2 Agentes selectivos e identificativos

Para la selección e identificación de las diferentes estirpes bacterianas y plásmidos se utilizaron los siguientes agentes selectivos, suministrados por Sigma-Aldrich (EEUU) a las concentraciones indicadas:

COMPUESTO	*E. meliloti* ORT12 (µg ml^{-1})	*E. medicae* SF3.41 (µg ml^{-1})	*E. coli* (µg ml^{-1})
Ampicilina (Ap)	ND	ND	100
Espectinomicina (Spc)	200	400	100
Gentamicina (Gm)	25	50	10
Kanamicina (Km)	60	30	30
Ácido nalidíxico (Nal)	ND	ND	20
Rifampicina (Rif)	50	50	25
Tetraciclina (Tc)	8	4	10
X-gal	-	-	40
Sacarosa	12,5%	12,5%	-

ND: No Determinado

La rifampicina se disolvió en metanol, la tetraciclina en etanol al 70% y el ácido nalidíxico en una solución de NaOH 0,1 M. Los demás antibióticos se disolvieron en agua. La temperatura de almacenamiento de los antibióticos fue de -20 ºC.

El X-gal, suministrado por Roche (Suiza), se disolvió en N, N-dimetilformamida (20 mg ml^{-1}) y también se conservó a -20 ºC.

1. 1. 3 Flavonoides

Los flavonoides se prepararon a una concentración de 1 mg ml^{-1} en etanol absoluto o metanol en el caso de la luteolina y se añadieron a los cultivos hasta alcanzar una concentración final de aproximadamente 1 µg ml^{-1}. La temperatura de almacenamiento fue de –20 ºC y fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

Los flavonoides que se utilizaron para la inducción de las estirpes fueron: Apigenina, coumestrol, crisina, daidzeína, 4,7-dihidroxiflavona, flavona, flavanona, genisteína, hesperetina, 5-hidroxiflavona, 7-hidroxiflavona, 6-hidroxiflavanona,

kaempferol, morina, naringenina, quercetina, umbelliferona, luteolina, fisetina e isoliriquitigenina.

1. 2 Medidas de pH, espectrofotometría y solución de congelación para bacterias

El pH de las soluciones se midió con un pH-metro modelo micropH 2001 (Crison, España). Para realizar las medidas espectrofotométricas se empleó el espectrofotómetro Novaspec II (Pharmacia LKB, Suecia) y el lector de placas Synergy HT (BioTek, USA).

Para conservar las estirpes bacterianas durante largos periodos de tiempo se utilizó una solución de congelación. Tras cultivar las bacterias en los medios apropiados, la biomasa procedente de 5 ml de cultivo se resuspendió en 1,5 ml de una solución compuesta de peptona al 0,5% (p/v) y de glicerol al 15% (v/v) previamente esterilizada en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 ºC). Las bacterias así preparadas se conservaron a -80 ºC.

1. 3 Medios de cultivo

1. 3. 1 Medios de cultivo para los rozobios

Los rizobios se cultivaron en los medios que se detallan a continuación. Los cultivos líquidos se incubaron en agitación a 180 rpm. Los medios se solidificaron, cuando fue necesario, añadiendo 20 g l^{-1} de agar. En ambos casos la temperatura de incubación fue de 28 ºC.

MEDIO TY (Behringer, 1974)	
Extracto de levadura	3 g
Triptona	5 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,65 g
H_2O destilada	Completar hasta 1 l
El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 ºC).	

Medio Mínimo (MM) (Robertsen *et al.*, 1981)	
K_2HPO_4	0,3 g
KH_2PO_4	0,3 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,15 g
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,05 g
$FeCl_3$	0,006 g
NaCl	0,05 g
Glutamato sódico	1,1 g
Manitol	10 g
Solución de vitaminas*	1 ml
H_2O destilada	Completar hasta 1 l
El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 ºC).	

Solución de vitaminas* (1000X)	
Biotina	0,02 g
Tiamina	0,01 g
Pantotenato sódico	0,01 g
H_2O destilada	Completar hasta 100 ml
Se esterilizó por filtración y se adicionó 1 ml por litro de MM ya estéril.	

Medio Bromfield	
Extracto de levadura	0,4 g
Triptona	0,1 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,1 g
Agar bacteriológico	3 g
H_2O destilada	1 l
El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 ºC).	

Medio BM (Basal Salt Medium) (Camacho *et al.*, 2002)	
K_2HPO_4	0,4 g
KH_2PO_4	0,1 g
$MgSO_4$	0,2 g
NaCl	0,1 g

$CaCl_2$	0,05 g
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,01 g
NH_4Cl	0,3 g
H_2O destilada	Completar hasta 1 l

El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 ºC). La Fuente de carbono a estudiar se añadió independientemente a una concentracion del 1%, antes del autoclavado.

Medio NBRIP (Katznelson y Bose, 1959)	
Glucosa	10 g
$Ca_3(PO_4)_2$	5g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	5g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g
KCl	0,2 g
$(NH_4)_2SO_4$	0,1 g
H_2O destilada	1 l

El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 ºC).

1.3.1.1 Medio de cultivo con diferentes concentraciones de NaCl

Para estudiar la capacidad de crecimiento de las estirpes con diferentes concentraciones de NaCl, se preparó medio YM líquido ajustando la concentración final de NaCl a 300, 450, 600, 700 y 800 mM. El pH se ajustó a 6,8 – 7 y el medio se autoclavó durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 ºC).

1.3.1.2 Medios de cultivo tamponados a diferentes pH

Para estudiar la capacidad de crecimiento de los aislamientos con diferente pH en el medio: 5; 5,5; 7; 8 y 8,5; se preparó medio YM líquido, se tamponó con diferente compuesto según el pH final deseado, posteriormente se ajustó al pH requerido y se autoclavó durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 ºC).

Tampones empleados	
pH 5	Homo-Pipes 20 mM
pH 5,5	Homo-Pipes 20 mM
pH 7	Mops 20 mM
pH 8	Tris-HCl 1M pH 8, 20 mM
pH 8,5	Ches 20 mM

1.3.1.3 Medios de cultivo para crecimiento con metales pesados

Para estudiar la tolerancia de los aislamientos a los metales pesados, se emplearon las siguientes formas de metales: $Na_2H\mathbf{As}O_4 \cdot 7H_2O$, $\mathbf{Co}Cl_2$, $K_2\mathbf{Cr}_2O_7$, $\mathbf{Cs}Cl$, $\mathbf{Cu}SO_4 \cdot 5H_2O$, $\mathbf{Ni}Cl_2$, $\mathbf{Zn}SO_4 \cdot 7H_2O$ y $\mathbf{Cd}Cl_2$. Se prepararon soluciones de estos compuestos a diferentes concentraciones, según los casos, y se esterilizaron por filtración. A continuación, se prepararon placas de TY añadiendo el volumen correspondiente de cada metal al medio ya estéril y enfriado a aproximadamente 50 ºC para ajustar la concentración final en la placa.

1. 3. 2 Medios de cultivo para *Escherichia coli*

Para cultivar las estirpes de *E. coli* se utilizó el medio rico de Luria-Bertani (LB). Los cultivos líquidos se incubaron en agitación a 180 rpm. Los medios se solidificaron, cuando fue necesario, añadiendo 20 g l^{-1} de agar. En ambos casos la temperatura de incubación fue de 37 ºC.

LB (Maniatis *et al.*, 1982)	
Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
NaCl	5 g
H_2O destilada	Completar hasta 1 l
El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 ºC).	

1. 4 Métodos relacionados con los ácidos nucleicos

1. 4. 1 Métodos de transferencia de ADN

1. 4. 1. 1 Conjugación bacteriana

Conjugación usando el plásmido pK*18mob*, pBBR1MCS-2 y pGUS3

Se utilizó para transferir plásmidos desde distintas estirpes de *E. coli* a *Ensifer*. Para ello, se mezclaron en un tubo eppendorf los siguientes cultivos:

- 800 µl de cultivo de las estirpes de *Ensifer* receptoras.
- 200 µl de un cultivo en fase logarítmica de la estirpe de *E. coli* donadora de los plásmidos.
- 100 µl de un cultivo en fase logarítmica de la estirpe de *E. coli*, portadora del plásmido pRK2013, que actuó como coadyuvante en la transferencia de los plásmidos.

A continuación, la mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 5000 *g*. El sobrenadante se retiró con cuidado y las células se resuspendieron en 200 µl de agua destilada estéril, volviendo a centrifugar a 5000 *g* durante 2 minutos, para retirar los restos de antibióticos. Seguidamente, se retiró el sobrenadante dejando alrededor de 75 µl para resuspender el pellet y se colocó en forma de gota en una placa con medio TY sin antibióticos. La placa se incubó a 28 ºC durante no más de 24 horas. La masa celular desarrollada se recogió y se resuspendió en 1 ml de glicerol-peptona. Posteriormente se realizaron las diluciones apropiadas para sembrar placas de TY con los antibióticos adecuados y así seleccionar las estirpes transconjugantes. Las colonias desarrolladas se purificaron por sucesivas siembras en el mismo medio selectivo.

Conjugación usando el plásmido pK*18mobsacB*

La construcción de mutantes por deleción se llevó a cabo utilizando el plásmido pK18*mobsacB*. Las estirpes de *Ensifer,* obtenidas por el método anteriormente descrito, sensibles a sacarosa y resistentes a Km (simples recombinantes), se inocularon en TY y

se incubaron durante alrededor de 4 días en agitación a 28 ºC. Transcurrido ese tiempo, se sembraron alícuotas de 100 µL, provenientes de diluciones seriadas del cultivo crecido, en placas de TY con sacarosa y se incubaron a 28 ºC. Una vez que las colonias resistentes a sacarosa crecieron, se picaron en dos placas una con Km y la otra con sacarosa. De esta forma se consiguieron los dobles recombinantes (sacarosa resistentes y Km sensibles).

1. 4. 1. 2 Transformación de *E. coli*.

Células competentes de *E. coli*

Se preinoculó una colonia de *E. coli* en 5 ml de medio LB con ácido nalidíxico, y se creció a 37 ºC en agitación durante toda la noche. Posteriormente, se inocularon 2,5 ml del cultivo crecido en 200 ml de medio LB, con el mismo antibiótico, y se incubó a 37 ºC en agitación hasta que la D.O. 600 nm fue de 0,4 - 0,5. El cultivo se enfrió en hielo durante 15 minutos.

Transcurrido este tiempo, el cultivo se centrifugó a 3500 *g* durante 10 minutos a 4 ºC. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 30 ml de la solución fría TBF-I. La mezcla se incubó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 3500 *g* durante 10 minutos a 4 ºC. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 4 ml de la solución TBF-II fría. Se repartieron alícuotas de 75 µl en eppendorfs, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 ºC hasta su uso.

Soluciones empleadas	
TFB-I	AcK 3 M pH 5,8; $MnCl_2$ 1 M; $CaCl_2$ 1 M; RbCl 1 M; Glicerol 15%
TFB-II	MOPS 1 M pH 7*, $CaCl_2$ 1 M, RbCl 1 M, Glicerol 15%

Las soluciones se esterilizaron en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 ºC).
* No se autoclava. Se filtra y se añade a la solución previamente esterilizada en el autoclave.

Transformación usando células competentes de *E. coli*

Las células de *E. coli* competentes se descongelaron en hielo durante 5 minutos. Se añadió el ADN plasmídico o la mezcla de ligación a cada vial, se pipeteó y se incubó

en hielo durante 20 minutos. Posteriormente, se incubó durante 90 segundos en un baño a 42 ºC y, una vez transcurrido ese tiempo, se incubó rápidamente en hielo durante 5 minutos. Se añadió 1 ml de medio LB y se incubó a 37 ºC durante una hora. Tras la incubación, se centrifugó durante 30 segundos a 10000 *g* y se descartó el sobrenadante, dejando alrededor de 75 µl, los cuales se usaron para resuspender el pellet. La mezcla se sembró en placas de medio LB, con los antibióticos adecuados, y se incubó a 37 ºC durante 24 horas.

1. 4. 2 Extracción del ADN genómico

Se centrifugaron 1,5 ml de un cultivo en fase estacionaria a 13000 *g* durante 1 minuto. El pellet se resuspendió en 570 µl de tampón TE y se añadieron 6 µl de proteinasa K (10 mg ml^{-1}) y 30 µl de SDS al 20%. La mezcla se incubó durante toda la noche a 37 ºC. Posteriormente, se potenció el lisado de las células mediante el uso de una jeringuilla por la que se pasó tres veces el contenido de la mezcla y se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), que se mezcló manualmente mediante la inversión repetida del tubo y se centrifugó a 13000 *g* durante 5 minutos. La fase superior acuosa donde se encuentra el ADN se transfirió a un nuevo tubo y se añadió un volumen de solución cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) mezclando las dos fases por inversión del tubo. Se centrifugó a 13000 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente y la fase superior (acuosa) se transfirió a un nuevo tubo. A continuación, se procedió a la precipitación del ADN. Para ello, se añadió 0,1 volumen de acetato sódico 3M y 0,8 volúmenes de isopropanol, se mezcló suavemente y se dejó precipitar a -20 ºC durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó a 13000 *g* durante 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante, el pellet se lavó con 500 µl de etanol al 70% (v/v) y se centrifugó a 13000 *g* durante 4 minutos. Finalmente, se dejó secar el precipitado de ADN a temperatura ambiente durante 30-40 minutos y se resuspendió en 100 µl de tampón TER.

Soluciones empleadas	
TE	Tris HCl 10 mM pH8, EDTA 1 mM
TER	Tris HCl 10 mM pH8, EDTA 1 mM, ARNasa 50 µg ml^{-1}

Además de este método manual, para la extracción del ADN total de las bacterias se utilizó el kit Quantum prep Aquapure Genomic DNA isolation kit (Bio-Rad, EEUU), cuando fue necesario, siguiendo las instrucciones del fabricante.

1. 4. 3 Extracción del ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se realizó siguiendo el protocolo descrito por Sambrook *et al*. (1989), con ciertas modificaciones. Se centrifugaron 1,5 ml de un cultivo en fase estacionaria a 13000 *g* durante 1 minuto. Tras la centrifugación, se desechó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 100 µl de solución I utilizando un vórtex. A continuación, se añadieron 200 µl de solución II y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces hasta que la mezcla se clarificó. Posteriormente, se añadieron 150 µl de solución III y se mezcló, para después centrifugar a 13000 *g* durante 10 minutos. El sobrenadante se pasó a un tubo vacío y se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se mezcló mediante vórtex y se centrifugó a 13000 *g* durante 5 minutos. La fase superior, acuosa, se pasó cuidadosamente a otro tubo con un pipeta y se le añadió un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se volvió a mezclar y se centrifugó a 13000 *g* durante 5 minutos. La fase superior se pasó cuidadosamente a otro tubo y se le añadieron 2,5 volúmenes de etanol absoluto. La mezcla se mantuvo a -80 ºC durante al menos 20 minutos para que el ADN precipitara y se centrifugó a 13000 *g* durante 20 minutos. El precipitado se lavó con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en 20 µl de tampón TER.

Soluciones empleadas	
Solución I	Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8
Solución II*	NaOH 0,2 M, SDS 1% (p/v)
Solución III	Acetato potásico 5 M [60% (v/v)], ácido acético glacial 11,5% (v/v)
Tampón TER	Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8, ARNasa 50 µg ml^{-1}

* Preparar en el acto

La extracción de plásmidos también se realizó, cuando fue necesario, utilizando los kits NucleoSpin Plasmid Quick Pure (Macherey-Nagel, Alemania) y GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, EEUU).

1.4.4 Extracción de ARN de *E. meliloti*

Para la obtención de ARN total de E. *meliloti* se utilizó el kit RNase-free DNase de Quiagen. Se tomaron 12 alícuotas de 1,5 ml de cada cepa o condición a evaluar. Las células se centrifugaron y tras retirar el sobrenadante, se lavaron con una solución de sarkosyl al 0,1% en tampón TE. A continuación, se congeló el pellet en nitrógeno líquido y se guardó a –80 ºC.

1. En el momento de su uso se descongelaron en hielo 4 viales de células por cada cepa o condición y se añadieron 100 µl de una solución de lisozima 4mg ml^{-1} en tampón TE, se mezcló mediante vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.
2. Se añadieron 350 µl de tampón RLT al que previamente se le habían adicionado 10 µl ml^{-1} de β-mercaptoetanol. Se mezcló por inversión manual y se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm para eliminar los restos celulares.
3. Se recogió el sobrenadante y en él se añadieron 250 µl de etanol absoluto y se mezcló por inversión manual.
4. Por cada columna de purificación se pasaron 2 viales, centrifugando 30 segundos a 13000 rpm y eliminando el sobrenadante cada vez.
5. A continuación se lavó cada columna con 750 µl de solución RW1 y se centrifugó a 13000 rpm durante 30 segundos.
6. Tras cambiar las columnas a nuevos tubos de recolección, se lavó la columna dos veces añadiendo 500 µl de tampón RPE y centrifugando a 13000 rpm durante 30 segundos.
7. Los restos de solución se eliminaron centrifugando las columnas a 13000 rpm durante 2 minutos.
8. La columna de purificación se colocó en un nuevo tubo de microfuga y se añadieron 30 µl de H_2O libre de ARNasa. Se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente para hidratar la resina y se centrifugó 1 minuto a 13000 rpm. Este paso se repitió, y se mezcló el ARN procedente de las dos extracciones realizadas para cada muestra hasta obtener un volumen final de 120 µl.
9. Al volumen total obtenido (120 µl) se añadieron 14 µl de solución tampón RDD (RNaase free DNAse set, Quiagen) y 6 µl de ADNasa. La mezcla se incubó durante dos horas a 28 ºC.
10. A continuación a los 140 µl de solución que contenían el ARN se añadieron 490 µl de la solución RLT con β-mercaptoetanol, 350 µl de etanol absoluto y se mezcló por inversión.

11. La solución se pasó por una columna RNeasy para retener el ARN (13000 rpm durante 30 segundos) y se continuó con su lavado.
12. La columna se lavó con 350 µl de solución RW1 y se centrifugó a 13000 rpm durante 30 segundos.
13. La columna se lavó dos veces añadiendo 500 µl de tampón RPE centrifugando a 13000 rpm durante 30 segundos.
14. Los restos de solución se eliminaron centrifugando las columnas a 13000 durante 2 minutos.
14. Finalmente, se añadieron 25 µl de agua libre de ARNasa sobre la resina de la columna. Esta se dejó hidratar por un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó durante 30 segundos a 13000 rpm. Este paso se repitió dos veces para obtener un volumen final de ARN de 50 µl.

1. 4. 5 Restricción del ADN

Se utilizaron las endonucleasas de restricción suministradas por Roche (Suiza) y New England Biolabs (EEUU). En todos los casos se siguieron las instrucciones del fabricante. La eficiencia de la restricción se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa.

1. 4. 6 Electroforesis del ADN

Se llevó a cabo en geles de agarosa entre el 0,8% y el 2% (p/v), dependiendo del peso molecular de la banda que se quisiera separar, preteñidos con bromuro de etidio y en tampón TAE 0,5X (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, como el ADN del fago λ digerido con la enzima de restricción *Hin*dIII. La electroforesis se llevó a cabo utilizando el aparato Mupid-One (Advance, Japón) a 50 ó 100 V. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV a 260 nm. Las imágenes se capturaron utilizando el aparato de captación de imágenes Gel Doc 2000 (Bio-Rad, EEUU) y analizándolas con el programa informático Quantity One (Bio-Rad, EEUU).

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

1. 4. 7 Aislamiento del ADN de geles de agarosa

Para recuperar el ADN de un gel de agarosa se cortó la porción de éste que contenía la banda de interés. El ADN se purificó mediante el kit NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

1. 4. 8 Conversión de extremos cohesivos en romos

Si la endonucleasa origina extremos 5' monocatenarios, éstos se pueden convertir en bicatenarios mediante la actividad polimerasa del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* en presencia de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP). Al igual que si tras la digestión con una determinada enzima de restricción se obtienen extremos cohesivos y se necesita hacerlos romos. Para ello, tras la digestión del ADN con la enzima adecuada en un volumen final de 20 µl, se añadió 1 µl de una solución de dNTP a una concentración de 1 mM y 1 unidad de la enzima Klenow. La reacción se incubó durante 15-20 minutos a 37 ºC. Posteriormente, se inactivaron las enzimas presentes en la reacción calentando a 75 ºC durante 10 minutos o mediante fenolización.

1. 4. 9 Ligación del ADN

Para clonar un fragmento de ADN en un vector, los fragmentos de ADN previamente digeridos con la(s) enzima(s) de restricción adecuada(s), tratadas con fenol y precipitadas con etanol absoluto, 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^{-1}) de la ligasa de T4 (Roche, Suiza; New England Biolabs, EEUU). La mezcla se incubó durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente. Los productos de la reacción se utilizaron para transformar células competentes mediante los métodos descritos anteriormente.

1. 4. 10 Amplificación del ADN por PCR

Se realizó siguiendo el protocolo descrito por Saiki (1990). Los programas usados en cada caso siguen el siguiente esquema común:

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

El volumen de la mezcla de reacción varió dependiendo del experimento. Como norma general, 20 µl de mezcla reacción contenían los cebadores adecuados a una concentración de 0,2 µM, dNTP a 0,2 mM, tampón de PCR 1X y 0,1 U de la enzima polimerasa. Las polimerasas usadas fueron: Taq polimerasa (New England Biolabs, EEUU), iTaq (Invitrogen, EEUU) y Velocity DNA polimerasa (Bioline, Inglaterra).

Los cebadores utilizados para la amplificación de fragmentos de ADN para su posterior clonación (Tabla 2) fueron diseñados con una longitud aproximada de 20 pb.

Los cebadores utilizados para ensayos de *q*PCR (Tabla 4) se diseñaron teniendo en cuenta que la longitud del amplicón estuviera comprendida entre 140 y 180 pb.

En ambos casos, éstos fueron diseñados manualmente teniendo en cuenta las siguientes características:

a. El porcentaje de G + C estuviera comprendido entre 55-65%

b. La temperatura de fusión (Tm) estuviera comprendida entre 55-65 ºC.

c. El no autopareamieno de los cebadores.

Tabla 2. Cebadores utilizados en esta Tesis para amplificar fragmentos de ADN o para secuenciación.

NOMBRE	SECUENCIA (5´- 3´)	pb	Tm (ºC)	REFERENCIA
LacZint-R	GCCTCTTCGCTATTACGCCA	20	57,3	J. M. Vinardell
616-F	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	20	52,1	Juretschko *et al.*, 1998
1522-R	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	20	61,4	Edwards *et al.*, 1989
519-R	GTTTCAGCMGCCGCGGTAATW	21	60,1	Lane *et al.*, 1985
907-R	CCC CGT CAA TTC ATT TGA GTT T	21	55	Muyzer *et al.*, 1997

NOMBRE	SECUENCIA (5´- 3´)	pb	Tm (°C)	REFERENCIA
ERIC1R	ATGTAAGCTCCTGGGGAT	18	52,7	Versalonic *et al.*, (1991)
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGGTGAGC	22	58,9	Versalonic *et al.*, (1991)
glnII12-F	YAAGCTCGAGTACATYTGGCT	21	55,3	Vinuesa et al., 2005b
glnII689-R	TGCATGCCSGAGCCGTTCCA	20	64,9	Vinuesa *et al.*, 2005b
nodAext-F	CGGGTACACACCACTCTCG	19	57,5	Esta Tesis
nodAext-R	TCCCGTAATCGCAGTTGCTC	20	57,5	Esta Tesis
nodC-F	AYGTHGTYGAYGACGGTTC	19	54,5	Laguerre *et al.*, 2001
nodC-R	CGYGACAGCCANTCKCTATTG	21	57,2	Laguerre *et al.*, 2001
cadA_2146-F	AAGATCGACACGGCCGTAAG	20	57,2	Esta Tesis
cadA_2146-R	CGTTGATCGTCACCAGGACA	20	57,1	Esta Tesis
cadA_28Emedic-F	CTCGTTCGAGGCTTTCCGAT	20	57,2	Esta Tesis
cadA_1641Emedic-R	CACCAGGATCTCCACCTTCAA	21	56,6	Esta Tesis
FGPS1490	TGCGGCTGGATCACCTCCTT	20	61,4	Navarro *et al.*, 1992
FGPL132	CCGGGTTTCCCCATTCGG	18	58,9	Ponsonnet y Nesme, 1994
nolG_2522-F	CACTATCGGCGGAATCGACA	20	57	Esta Tesis
nolG_2522-R	GTGTGGAGCCCGTAAACAGA	20	57,2	Esta Tesis
nolG+27F-KpnI	CATGGTACCATCATCGAGGGCATCTGAGG	29	57	Esta Tesis
nolG+40R-XbaI	ATCTCTAGACGTCCGAAAGGGAAATCTCATG	31	57	Esta Tesis
nolG+27F-XhoI-Smedic	CATCTCGAGATCATCGAGGGCATCTGAGG	29	57	Esta Tesis
nodN+39F-KpnI	GCTGGTACCAGCCAGGATCAGTTAGGGAC	29	57	Esta Tesis
nodN+129R- XbaI	TCCTCTAGATTCCAATCCCATTCCCTTGC	29	57	Esta Tesis
nolGsecF1623-1642	CATGTTTGTCGTCAGCCTGC	20	57	Esta Tesis

NOMBRE	SECUENCIA (5´- 3´)	pb	Tm (ºC)	REFERENCIA
nolGsecF917-937	TGAACGCAGAACTGACAAAGG	21	55,6	Esta Tesis
nolGsecR1339-1320	GAAACACAGCGACGATGCAC	20	57,1	Esta Tesis
nolGsecR2054-2035	ATGTGATCGGAGATCCGTCG	20	56,5	Esta Tesis

Tabla 3. Cebadores utilizados en esta Tesis para amplificar fragmentos de ADN para la mutagénesis *in vitro* por deleción mediante PCR solapante.

NOMBRE	SECUENCIA (5´- 3´)	pb	Tm (ºC)	REFERENCIA
nolG-AF-EcoRI	CGCGAATTCCCCAACTGATG ACTATTGTCG	30	54	Esta Tesis
nolG-BR	TCATGCACGCGACCCCCTCAG ATGCCCT	20	49	Esta Tesis
nolG-CF	AGGGCATCTGAGGGGGTCGC GTGCATGA	28	52	Esta Tesis
nolG-DR-HindIII	AGGAAGCTTTCCTGGACGGA CATTTCCAC	29	58	Esta Tesis

1.4.11 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Esta técnica se realizó digiriendo el producto de PCR deseado con la enzima adecuada suministrada por Roche (Suiza) o New England Biolabs (EEUU). La digestión se hizo siguiendo las instrucciones del fabricante y posteriormente, para ver el perfil de bandas obtenido, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% con una intensidad de 100 V durante 30 minutos, parando la electroforesis cada 10 minutos para captar la imagen de la progresiva separación de las bandas.

1. 4. 12 Mutagénesis *in vitro* por deleción mediante PCR solapante

Esta técnica está basada en el método de Griffits y Long (2008), con algunas modificaciones. Se realizaron los siguientes pasos de amplificación por PCR:

1.-Amplificación de fragmentos de 500 pb de longitud, de las regiones flanqueantes al gen que se desea mutagenizar. Para ello, se añadió en un volumen de 20 µl: 10 ng de ADN genómico, 0,2 µM de cada cebador (cebadores A y B para la PCR de la región flanqueante derecha y cebadores C y D para la PCR de la región flanqueante izquierda; Tabla 3); 0,2 mM de dNTP y 0,1 U de una polimerasa de alta fidelidad. Se siguió el esquema general descrito anteriormente para la programación del termociclador.

2.- PCR solapante usando como ADN molde ambos productos amplificados en el paso

anterior. A la mezcla de 20 µl de reacción se le añadieron 2 ng de cada fragmento de ADN molde, 0,2 µM de los cebadores A y D; 0,2 mM de dNTPs y 0,1 U de la polimerasa. Esta PCR comenzó con dos ciclos en los que las temperaturas de desnaturalización y polimerización fueron menores que la que se establece en el esquema general. De esta forma se favoreció que los dos fragmentos que se usaron como ADN molde se mantuvieran unidos. A continuación, se dieron 35 ciclos como sigue el esquema de PCR que se describe anteriormente. Un esquema de este método de deleción se muestra en la Figura 12.

El amplicón obtenido en este último paso, que contiene las regiones flanqueantes al gen delecionado, se cortó con las enzimas *Eco*RI y *Hin*dIII y se clonó en el plásmido pK18*mobsacB* para su posterior transformación en *E. coli* y conjugación con la estirpe E. *meliloti* ORT12, obteniéndose la estirpe mutada por deleción mediante doble recombinación y selección en medio suplementado con la concentración de sacarosa adecuada.

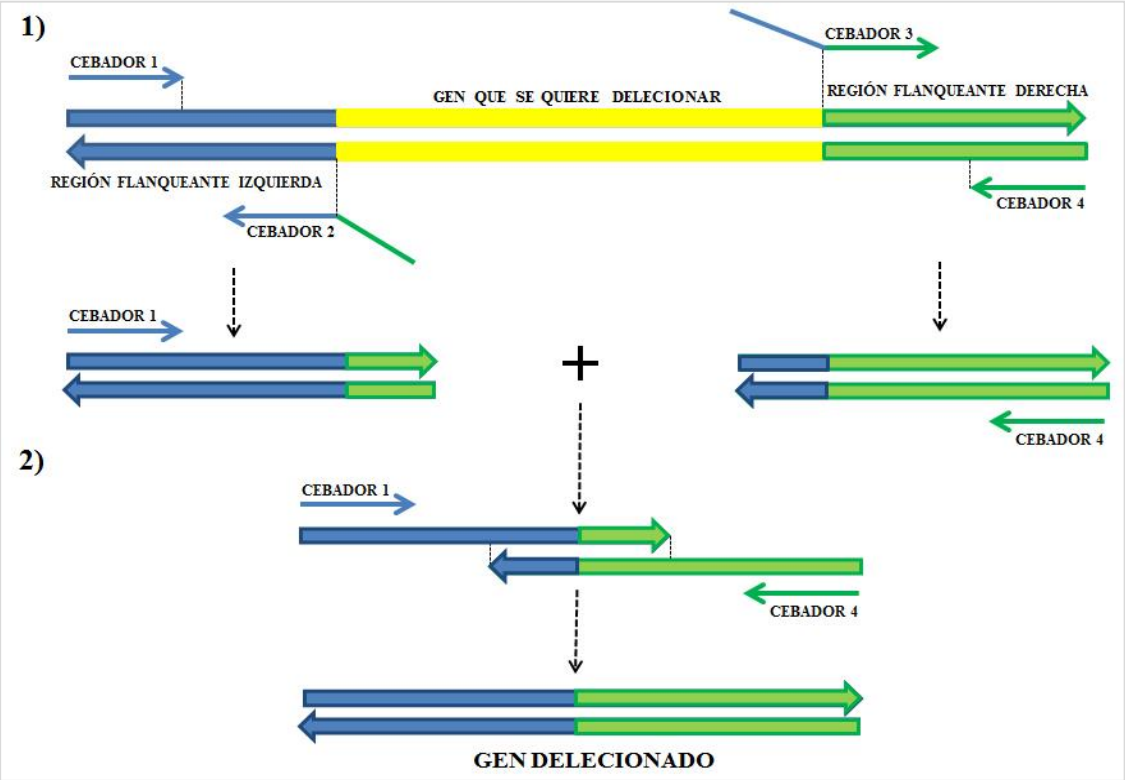


Figura 12: Esquema de la mutagénesis *in vitro* por deleción mediante PCR solapante.

1. 4. 13 Hibridación ADN:ADN, (Southern blot)

Se empleó un sistema no radiactivo que se basa en el marcaje al azar de ADN con digoxigenina-UTP y la detección de los híbridos ADN:ADN-digoxigenina mediante enzimoinmunoensayo. Para esta detección se utilizó un anticuerpo conjugado (antidigoxigenina conjugado con la enzima fosfatasa alcalina). El resultado de la hibridación se obtuvo por reacción colorimétrica en el mismo filtro de hibridación.

Transferencia del ADN a filtros de nylon

Una vez realizada la electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos de ADN, junto con el marcador de peso molecular marcado con digoxigenina (Roche, Suiza), se transfirieron a filtros de nylon (Southern, 1975) Hybond-N (Amersham Biosciences, Inglaterra). Para ello, el gel, inmediatamente después de la electroforesis, se sumergió en HCl 0,25 M durante 20 minutos con agitación suave. Posteriormente, se lavó con agua destilada y se mantuvo en una solución de desnaturalización durante 30 minutos en agitación. La transferencia del ADN a los filtros se realizó por presión durante aproximadamente 15 horas en presencia del tampón de transferencia alcalino. Transcurrido ese tiempo, el filtro se lavó en SSC 2X durante 5 minutos. Finalmente, el ADN se fijó al filtro por exposición a la luz ultravioleta durante 2,5 minutos.

Soluciones empleadas	
SSC 20X	NaCl 2,1 M, citrato de sodio 0,3 M. Ajustar el pH a 7
Solución de desnaturalización	NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M
Tampón de transferencia alcalino	NaCl 1,5 M, NaOH 0,25 M

Marcaje de la sonda

El marcaje de la sonda se realizó mediante una PCR en la que se añadió a la mezcla normal de PCR, 1 µl de dNTP 10X que contiene UTP marcado con digoxigenina.

Hibridación de la sonda al ADN del filtro

Al filtro de nylon se le añadió la solución de prehibridación (entre 1 y 10 ml, dependiendo del tamaño del filtro), que contenía esperma de salmón (100 µg ml^{-1}) previamente desnaturalizado por calor (95 ºC durante 10 minutos y 5 minutos en hielo). El filtro se prehibridó con esta solución incubándolo de 2 a 6 horas a 42 ºC (en condiciones de homología entre la sonda y la muestra a hibridar). Transcurrido este tiempo, se retiró la solución de prehibridación y se añadió la sonda, previamente desnaturalizada por calor (95 ºC durante 10 minutos y 5 minutos en hielo) y diluída en 2,5 ml de solución de prehibridación. El filtro se incubó con esta nueva solución durante toda la noche a 42 ºC. Transcurrido este tiempo, se procedió a lavar el filtro. Se lavó dos veces con una solución de SSC 2X, SDS 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavó otras dos veces con SSC 1X, SDS 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente y, por último, se realizaron dos lavados más con SSC 0,1X, SDS 0,1% durante 15 minutos a 68 ºC.

Soluciones empleadas	
SSC 20X	NaCl 2,1 M, citrato de sodio 0,3 M. Ajustar el pH a 7
SDS 20%[a]	SDS 200 g l^{-1}
Solución de prehibridación[b]	100 ml SSC 20X (v/v); 0,4 ml SDS 20% (p/v); 100 ml agua Milli-Q; 20 g de reactivo de bloqueo (Roche); 0,4 g N-laurilsarcosina

[a] Calentar 800 ml de agua destilada, añadir el SDS, ajustar el pH a 7,2 y enrasar a 1 l con agua destilada.
[b] Disolver el reactivo de bloqueo con agitación magnética y calor y añadir el mismo volumen de formamida desionizada. Se almacena a -20 ºC.

Detección inmunológica

Después de realizar los lavados, el filtro se incubó durante 5 minutos en 100 ml de tampón 1 a temperatura ambiente y en agitación, para eliminar los restos de SDS. Posteriormente, los filtros se introdujeron en bolsas de hibridación junto con 10 ml de tampón 2 y se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. A continuación, se retiró el tampón 2 y se cambió por una nueva solución de tampón 2 que contenía el anticuerpo antidigoxigenina en una proporción de 1:5000

(v/v). El filtro se incubó en esta solución durante 45 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Para eliminar el anticuerpo no fijado, el filtro se extrajo de las bolsas y se lavó dos veces durante 15 minutos en 100 ml de tampón 1 a temperatura ambiente con agitación. Finalmente, el filtro se equilibró en 50 ml de tampón 3 durante 5 minutos. Para visualizar el resultado se usó un método colorimétrico que consiste en introducir los filtros en bolsas de hibridación herméticamente selladas junto con una solución de revelado. Las bolsas se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad hasta que el resultado de la hibridación fuera claramente visible. Posteriormente los filtros fueron lavados con agua destilada y se secaron al aire.

Soluciones empleadas	
Tampón 1	Tris-HCl 100 mM pH 8 y NaCl 150 mM
Tampón 2	Reactivo de bloqueo al 2% (p/v) disuelto en tampón 1
Tampón 3	Tris-HCl 80 mM pH 9,5; NaCl 100 mM y $MgCl_2$ 50 mM
Solución de revelado	66 µl de solución NBT (75 mg ml^{-1} de nitroazul tetrazolio en dimetilformamida al 70%), 66 µl de solución BCIP (50 mg ml^{-1} de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato en dimetilformamida al 100%) en 10 ml de tampón 3

* Disolver el reactivo de bloqueo con agitación magnética y calor. Almacenar a 4 ºC.

1. 4. 14 Secuenciación del ADN

La secuenciación del ADN se llevó a cabo en los servicios de secuenciación de la empresa STAB VIDA (Portugal).

1. 4. 15 Análisis informático de secuencias de ADN y construcción de árboles filogenéticos

La homología de las secuencias se realizó utilizando el algoritmo BLAST (Altschul y col., 1990). Este algoritmo de búsqueda utiliza una secuencia de fragmentos cortos de la secuencia analizada para encontrar secuencias homólogas entre bases de datos de ADN. Se empleó la interfase disponible en el NCBI (National Centre for Biotechnology Information) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast. Las secuencias del gen ARNr 16S se analizaron en la base de datos Ez-Taxon (http://www.ezbiocloud.net/eztaxon).

Los alineamientos de las secuencias obtenidas con las secuencias a comparar, se hicieron con el programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997). Los análisis filogenéticos y de

evolución molecular se hicieron usando el programa MEGA versión 4 (Tamura *et al.*, 2007); con tres algoritmos diferentes para realizar el árbol, máximum-likelihood, (Felsenstein, 1981), maximum-parsimony (Kluge y Farris, 1969) y neighbour-joining (Saitou y Nei, 1987).

1.4.16 RT- *q*PCR (Reverse transcription quantitative real-time PCR)

1.4.16.1 Comprobación de la integridad del ARN

Previamente al uso del ARN para la síntesis del ADNC, se comprobó su integridad. Para ello, se mezclaron 2 µl de ARN, 1 µl de H_2O y 3 µl de tampón de carga con bromuro de etidio. Esta mezcla se incubó 10 minutos a 65 ºC y después se mantuvo 5 minutos en hielo. Posteriormente se cargó en un gel de agarosa al 1,4% (p/v) y se corrió una electroforesis durante 15 minutos a 120 V.

1.4.16.2 Síntesis de ADNc para RT-*q*PCR

La síntesis de ADNc para RT-*q*PCR se realizó desde las muestras de ARN total siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

1. Se mezclaron 1 µg de ARN total, 1 µl de una solución conteniendo 100 ng μl^{-1} de una mezcla de cebadores (Random Primers, Roche), 1 µl de una mezcla 10 mM de dNTP y se completó el volumen hasta 12 µl con agua MilliQ.
2. La muestra fue incubada a 65 ºC durante 5 minutos y transferida inmediatamente a hielo.
3. Se añadieron 5 µl de tampón de síntesis 5x (First-strand, Invitrogen), 2 µl de 0,1 M DTT y 1 µl de inhibidor de ARNasa (40 U μl^{-1}, Protector RNAse inhibitor. Roche)
4. La mezcla se incubó a 25 ºC durante 2 minutos, se añadió 1 µl de reverso transcriptasa (Superscript II reverse transcriptase, 200 U μl^{-1}, Invitrogen) y se incubó a 25 ºC durante 10 minutos para la unión de los cebadores y, posteriormente, 50 minutos a 42 ºC para la síntesis de ADNc.
5. Finalmente para inactivar la enzima y parar la reacción se sometió a la mezcla a 65 ºC durante 10 minutos.

1.4.16.3 Reacción de amplificación para la cuantificación de la expresión génica relativa. RT- *q*PCR

La amplificación de los fragmentos de ADNc para la cuantificación de los niveles de ARN mensajero se realizó utilizando iQ Supermix ADN polimerasa de BioRad. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador IQ de BIORAD. La mezcla para la reacción contenía: 1µl de ADNc, 0,5 µl de los cebadores específicos del gen a estudiar a una concentración de 10 µM, 12,5 µl de iQ Supermix y 10 µl de agua MilliQ. El programa estándar de amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 95 ºC durante 3 minutos, precedido de 35 ciclos de amplificación y cuantificación de 30 segundos a 95 ºC, 45 segundos a 55 ºC y 45 segundos a 72 ºC. A continuación, se llevaron a cabo 1 ciclo de 1 minuto a 95 ºC, otro ciclo de 1 minuto a 70 ºC y 90 ciclos de 10 segundos a 55 ºC. Terminada la reacción se realizó un análisis de la curva de Melting o curva de fusión para la determinación de la formación de productos específicos. En la tabla 4. se muestran los cebadores utilizados en RT-*q*PCR en esta Tesis.

Tabla 4. Cebadores empleados en RT-*q*PCR.

CEBADOR	SECUENCIA	pb	Tm (ºC)	Referencia
rRNASm-F	TCTACGGAATAACGCAGG	18	54	Esta Tesis
rRNAa-Ret-R	GTGTCTCAGTCCCAATGT	18	54	Esta Tesis
qnodA-F	CGGTGCTTTGACTCCAAC	18	56	Esta Tesis
qnodA-R	TTCACCTCTGCGATGCTC	18	56	Esta Tesis
qnolG-F2	CACAGCAGTCAAAGGAGG	18	56	Esta Tesis
qnolG-R2	ATCCGACCACTTCCGAAC	18	56	Esta Tesis
qnodN ORT12F	TTCAGCGGTATGCCGAAG	18	56	Esta Tesis
qnodN ORT12R	CAACCGTCACGTTGTAGG	18	56	Esta Tesis

1. 5 Métodos utilizados en el estudio de las bacterias

1.5.1 Medida de la actividad β-galactosidasa

Se realizaron ensayos de actividad β-galactosidasa (β-gal) para cuantificar la actividad de diversos genes en estudio. Para ello se empleó el método desarrollado por Miller (1972). Brevemente, a partir de cultivos bacterianos en fase exponencial se reinocularon tubos con 3 ml de YM líquido (suplementado con flavonoides cuando fue

necesario) que se dejaron crecer hasta alcanzar una D.O. 660 nm de 0,2-0,3 (inicio de la fase exponencial). Se tomaron muestras de 200 µl de estos cultivos que se mezclaron con 800 µl de tampón Z, 20 µl de cloroformo y 10 µl de SDS al 0,1% (p/v). La mezcla se agitó vigorosamente durante 15 segundos para favorecer la lisis celular. A continuación se añadieron 200 µl de ONPG (4 mg ml^{-1} en tampón Z) y se dejó incubando a 28 ºC hasta que la mezcla adquiriese un tono amarillo. En este momento la reacción se detuvo añadiendo 500 µL de Na_2CO_3 1 M y se midió la D.O. 420 nm.

La actividad β-galactosidasa en unidades Miller se calculó mediante la siguiente fórmula:

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

donde ***t*** es el tiempo transcurrido desde la adición de ONPG hasta que se detuvo la reacción.

Tampón Z	
$Na_2HPO_4 \cdot H_2O$	16,68 g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	6,24 g
KCl	0,75 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g
H_2O destilada	Completar hasta 1l

El pH del tampón se ajustó a 7,0.

1.5.2 Estudio de los lipopolisacáridos (LPS)

Extracción de los LPS

Se siguió el método descrito por Köplin *et al.* (1993). Tubos con 3 ml de TY fueron inoculados con las estirpes en estudio y se dejaron crecer en agitación a 28 ºC durante tres días (fase estacionaria). Se tomaron 1,5 ml de estos cultivos y se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 minutos. Los sobrenadantes fueron extraídos con una pipeta y se desecharon. Los sedimentos que contienen las células fueron resuspendidos en 1 ml de

NaCl al 0,9%; se centrifugaron de nuevo a 8000 rpm durante 5 minutos y se lavaron tres veces con NaCl 0,9%. En el último lavado se eliminaron cuidadosamente los restos de NaCl y las células se lisaron añadiendo 125 µl de tampón I, agitándolas vigorosamente e hirviéndolas durante 6 minutos. Transcurrido este tiempo, se dejaron enfriar las muestras, se les añadió 875 µl de tampón II y se trataron con 3 µl de ARNasa (10 mg ml^{-1}) y 10 µl de ADNasa (1 mg ml^{-1}), dejándolas incubar durante 4 horas a 37 ºC. Posteriormente, se trataron con 10 µl de proteinasa K (10 µg ml^{-1}) dos veces, incubándolas a 37 ºC durante 24 horas en cada tratamiento. A las muestras, con las células ya lisadas, se les añadió tampón de resuspensión en proporción 1:1, se mezclaron bien y se hirvieron durante 6 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm durante 7 minutos y se tomaron 600 µl del sobrenadante. Las muestras finales se almacenaron a –20 ºC.

Soluciones empleadas	
Tampón I (LPS)	Tris-HCl 60 mM, SDS 2%, EDTA 1 mM pH 6,8
Tampón II (LPS)	Tris-HCl 60 mM, EDTA 1 mM pH 6,8
Tampón de resuspensión (LPS)	5,9 ml de tampón I; 4 ml de glicerol; 0,8 ml de β-mercaptoetanol; azul de bromofenol al 0,05% (p/v)

Electroforesis de LPS (SDS-PAGE)

La electroforesis de los LPS se realizó en un gel de poliacrilamida unidireccional, en el tanque MiniProtean™ II (BIO-RAD, CA) a 200 V durante 45-60 minutos.

Tinción de los LPS

Los geles se sumergieron en solución de fijación durante al menos 3 horas en agitación. Transcurrido ese tiempo se cambió la solución de fijación por otra de oxidación y se dejó en agitación durante 10 minutos y oscuridad. Posteriormente se hicieron 5 lavados con agua destilada de 5 minutos y se tiñeron con solución de tinción durante 30 minutos en oscuridad total. Tras un par de lavados breves con abundante agua destilada, los geles se revelaron con solución de revelado. La reacción se detuvo

lavando los geles con agua destilada cuando se distinguieron con claridad las bandas correspondientes a los LPS.

Soluciones empleadas	
Solución de fijación*	Etanol 50% (v/v), ácido acético glaciar 12,5% (v/v)
Solución de oxidación*	Solución de fijación con $NaIO_4$ al 0,7% (p/v)
Solución de tinción*	$AgNO_3$ 0,1% (p/v)
Solución de revelado*	Na_2CO_3 3% (p/v); 35 µl/100 ml de formaldehído 35%.

*Las soluciones se completaron con agua tipo MilliQ.

1.5.3 Producción de Ácido Indol Acético (AIA)

Se realizó según el método descrito por Patten y Glick, (2002). Se estudió la producción de ácido indol acético (AIA) creciendo las bacterias en medio YM suplementado con triptófano (1 g l^{-1}). El ensayo se realizó en placas de multipocillos utilizando el reactivo de Salkowski. En cada pocillo se pusieron 100 µl de reactivo de Salkowski y 100 µl del sobrenadante del cultivo en fase estacionaria de cada uno de los aislamientos, asegurándonos de mezclar bien. Se dejó desarrollar la reacción (unos 30 minutos aproximadamente) hasta la aparición del color. Posteriormente, se midió la D.O. 535 nm. En paralelo se realizó una recta de calibrado con concentraciones conocidas de AIA, lo que permitió cuantificar el AIA producido por estas bacterias.

Soluciones empleadas	
Reactivo Salkowski (Bric *et al*., 1991)	H_2SO_4 al 98% 150 ml, H_2O destilada.250 ml, $FeCl_3$ 0,5 M 7,5 ml

Esperar a que la reacción del ácido y el agua se enfrié antes de añadir el cloruro férrico. Conservar a 4 ºC.

1.5.4. Solubilización de fosfatos

Se empleó el método descrito por Shekhar, (1999). Se obtuvieron cultivos de cada aislamiento en medio YM a D.O. 600 nm igual a 1 y se dispusieron gotas de 10 µl de esos cultivos sobre placas de medio NBRIP, conteniendo fosfato tricálcico como fuente de fósforo. Las placas se incubaron durante 10 días a 28 ºC y posteriormente se midió el diámetro formado por el halo de solubilización. Así se pudo comparar la capacidad solubilizadora de los distintos aislamientos

1.5.5 Obtención de autoinductores (AI) de los sobrenadantes de cultivos bacterianos

Para la obtención de AI de los sobranadantes de cultivos bacterianos, las bacterias en estudio se crecieron en 5 ml de medio YM o TY, a 28 ºC, en agitación durante el tiempo adecuado y, tras ello, se centrifugaron los cultivos y se tomaron los sobrenadantes para posteriores ensayos.

1.5.6 Ensayos de detección de AI

Para la detección de AI producidos por las tres estirpes bacterianas se llevaron a cabo ensayos de difusión en placa de Petri usando al biosensor *A. tumefaciens* NT1(pZRL4) tal y como se describe por Cha *et al*. (1998). El método consistió en colocar cilindros metálicos de 0,8 cm de diámetro por 1 cm de altura previamente esterilizados en placas de Petri sobre las que se dejó solidificar medio YM con agar. Acto seguido se añadió a cada placa 4 ml de agar de cobertera con 400 µl de cultivo crecido hasta fase estacionaria del biosensor A. tumefaciens NT1 (pZRL4) y 40 µl de X-Gal (20 mg/mL). Después de solidificarse se retiraron los cilindros metálicos y en cada pocillo se añadieron aproximadamente 200 µl de los sobrenadantes bacterianos obtenidos previamente. Las placas se incubaron 48 horas a 28 ºC.

1.5.7 Tolerancia a metales pesados de las bacterias aisladas

1.5.7.1 Método del parche

Se emplearon placas de TY con las siguientes formas de metales: $Na_2H\mathbf{As}O_4 \cdot 7H_2O$, $\mathbf{Co}Cl_2$, $K_2\mathbf{Cr_2}O_7$, $\mathbf{Cs}Cl$, $\mathbf{Cu}SO_4 \cdot 5H_2O$, $\mathbf{Ni}Cl_2$, $\mathbf{Zn}SO_4 \cdot 7H_2O$, $\mathbf{Cd}Cl_2$, como se explicó anteriormente. A continuación, se inocularon gotas de 10 µl de cultivos al final de la fase logarítmica de las bacterias diluidos 10 veces, hasta una D.O. de 0,1. Las placas se incubaron durante 5-7 días a 28º C, estableciendo la concentración mínima inhibitoria (CMI) como la más baja a la cual no se producía crecimiento de las estirpes.

1.5.7.2 Método de difusión en disco

La resistencia a metales pesados se analizó también mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer (Bauer *et al.,* 1966). Para ello, se inoculó un cultivo bacteriano en profundidad en placas de medio TY mezclando 2 ml de cultivo (D.O. 600

nm ~ 0,6) con 25 ml de medio TY (1% agar) templado. Una vez solidificado el medio, se dispusieron sobre el mismo, discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro a los que se añadieron 5 µl de diferentes concentraciones de $NiCl_2$, $CoCl_2$, $CuSO_4$, $ZnSO_4$ y $CdCl_2$. Las placas se incubaron a 28º C durante 2 días y se midieron los diámetros (mm) de las zonas de inhibición alrededor de cada disco.

1.5.8 Electroforesis de plásmidos de alto peso molecular

Se siguió el método descrito por Eckhardt (1978). Cultivos de rizobios en fase logarítmica (D.O. 480 nm ~ 0,2 - 0,3) crecidas en medio TY se centrifugaron a 8000 rpm durante 4 minutos. Tras descartar el sobrenadante, el sedimento se lavó con tampón TBE 1X y se resuspendió en 25 µl de tampón de carga. Las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 0,5% (p/v) en TBE 1X en el que se había preparado una "piscina" de agarosa al 0,4% (p/v) con SDS al 15% (p/v) en la parte posterior de los pocillos que queda próxima al polo negativo (ánodo) del tanque. Esto permitió la lisis *in situ* de las bacterias durante la electroforesis, que se desarrolló durante 30 minutos a 20 V, seguida de 4 horas a 100 V.

Los geles de agarosa se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (1 mg ml^{-1}) y los plásmidos teñidos se observaron en un transiluminador de luz UV_{260nm}. A continuación, se capturaron las imágenes de los plásmidos utilizando el aparato de captación de imágenes Gel Doc 2000 (Bio-Rad, EEUU) y analizándolas con el programa informático Quantity One (Bio-Rad, EEUU).

Soluciones empleadas	
Tampón TBE 1X	Trizma base 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM
Tampón de carga (Eckhardt)	475 µl de Tris-Ficoll [Ficoll al 12,5% (p/v) en Tris-HCl 25 mM], 100 µl de lisozima* [2,5 mg/100 µl de H_2O bidestilada], 25 µl de ARNasa [400 µg ml^{-1} en Tris-HCl 10 mM, pH 7,5], 25 µl de azul de bromofenol [0,55% (p/v) en Tris-Ficoll]

* Se prepara en el acto.

1.5.9 Curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento se determinaron en tubos de vidrio con 3 ml de medio TY o Bromfield con antibióticos en caso de que estirpe portara algún plásmido, y con la

concentración adecuada de $CdCl_2$, $ZnSO_4$ o luteolina cuando fue necesario. Se partió de una densidad celular inicial de 5 × 10^7 células ml^{-1}, diluyendo de un preinóculo de TY crecido con antibióticos hasta D.O. 600 nm = 1. La turbidez de los cultivos se determinó a intervalos regulares de tiempo en un espectofotómetro a una D.O. 600 nm.

1.5.10 Ensayos de movilidad de tipo *swimming*

Las cepas de *E. meliloti* y *E. medicae* se crecieron en agitación a 28 ºC en medio TY líquido hasta una D.O. 600 nm de 0,9 -1. Se prepararon placas Petri con 25 ml de medio Bromfield 0,3% de agar, suplementado o no con luteolina (1 µg ml^{-1}) dependiendo del experimento. Éstas se solidificaron a temperatura ambiente tapadas durante al menos dos horas. Se colocaron alícuotas de 3 µl del cultivo introduciendo la punta de pipeta hasta aproximadamente en la mitad del grosor del medio de cultivo que contiene la placa. Tras la colocación de las gotas, las placas se rodearon de parafilm y se incubaron boca abajo durante 6 días.

Para facilitar la comparación de la movilidad *swimming* de los mutantes construidos con respecto a la cepa parental, se procedió a medir el diámetro del halo de dispersión de la colonia a los 6 días de incubación y se calculó la media. Los resultados obtenidos de un mínimo de tres experimentos independientes (con al menos 3 réplicas técnicas), se les aplicó la desviación estándar.

2. Materiales y métodos utilizados para los estudios con plantas

Los estudios con plantas cuyos resultados se muestran en esta Tesis se realizaron en colaboración con la Dra. María Camacho Martínez-Vara de Rey y el Dr. Francisco Temprano Vera (IFAPA, Junta de Andalucía) Sevilla, investigadores ambos, del proyecto dentro del cual se realiza esta Tesis.

2. 1 Plantas

Las plantas empleadas en esta Tesis están recogidas en la Tabla 5.

Tabla 5. Plantas utilizadas en esta Tesis.

ESPECIE
***Medicago sativa* variedad Aragón**
Medicago marina

ESPECIE
Medicago truncatula
Medicago polymorpha
Medicago murex
Medicago minima
Medicago orbicularis

2.2 Aislamientos de las bacterias de los nódulos

Los nódulos se separaron de las raíces y se desinfectaron mediante un tratamiento con hipoclorito al 6% durante 5 minutos. A continuación, se enjuagaron abundantemente con agua destilada y se rodaron en cajas de medio YM rojo congo 25 ppm, para comprobar que la superficie del nódulo no presentaba bacterias. Posteriormente, los nódulos se machacaron en condiciones asépticas mediante el uso de una espátula estéril y su contenido se sembró en placas de YM rojo congo 25 ppm, para obtener colonias aisladas. Una vez crecidas, las colonias con distinta morfología se sembraron en placas independientes para aislarlas o comprobar su capacidad de crecimiento con distintos antibióticos.

2. 3 Soluciones nutritivas para las plantas

Para el crecimiento de las plantas se utilizó la solución de Rigaud y Puppo carente de nitrógeno combinado.

Solución Rigaud-Puppo (Rigaud y Puppo, 1975)	
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
KH_2PO_4	0,2 g
K_2SO_4	0,2 g
Quelantes de hierro (Sandofer)	0,2 g
Solución de Gibson*	1 ml
H_2O destilada	Completar hasta 1 l

Añadir primero la solución de Gibson y después añadir uno a uno el resto de componentes esperando siempre a que se disuelva antes de añadir el siguiente. El pH del medio se ajustó a 6,5 -7,0 con KOH y posteriormente se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121ºC).

Solución de micronutrientes de Gibson*	
H_3BO_3	2,86 g
$MnSO_4H_2O$	2,08 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,22 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,08 g
Na_2MoO_4	0,13 g
H_2O destilada	Completar hasta 1 l

2. 4 Desinfección y germinación de semillas

Las semillas de *M. sativa* (cv. Aragón) se desinfectaron mediante un tratamiento con etanol de 96º durante 30 segundos, seguido de otro con hipoclorito sódico al 6% durante 15 minutos. Tras ello, las semillas se lavaron siete veces con abundante agua destilada estéril hasta que el agua de lavado alcanzó un pH de 7. Las semillas desinfectadas se colocaron en placas de Petri que contenían agar-agua [1% (p/v)] y se incubaron en oscuridad y a 28 ºC hasta su germinación.

Las semillas de las demás especies de *Medicago* estudiadas se desinfectaron de forma similar con la única diferencia de que no se les hizo el lavado inicial con etanol de 96º y que el tiempo que se mantuvieron el hipoclorito de sodio al 6% fue de 6 minutos.

2. 5 Ensayos de eficiencia

Los ensayos de eficiencia que se realizaron para analizar las propiedades simbióticas de las estirpes se inocularon y cultivaron de la siguiente forma. Una sola plántula se transfirió a cada tubo que contenía Rigaud y Puppo 0,5X solidificado con agar al 0,7%. Las estirpes se cultivaron en medio YM durante 48 horas, y se inocularon 100 µl del cultivo por tubo, con el objetivo de que finalmente hubiera aproximadamente 10^8 células semilla^{-1}. Este ensayo se llevó a cabo en cámara de plantas con un fotoperiodo de 12 horas de luz (con intensidad de 400 µE m^{-2} s^{-1}) y 12 horas de oscuridad a, 24 ºC y 18 ºC, respectivamente. Se mantuvieron en la cámara de plantas durante 8 semanas. Pasado este tiempo se determinó el número y peso seco de los nódulos y el peso seco de la parte aérea.

Los análisis estadísticos de los resultados fueron realizados con el programa Statistix for Windows Analytical software, usando el test adecuado.

Secado de nódulos y parte aérea de la planta

Tanto la parte aérea de las plantas como los nódulos se secaron en una estufa para desecación (J.P. Selecta) a 80 ºC durante 48 horas con el flujo de aire abierto. Transcurrido ese tiempo se dejaron otras 24 horas con el horno apagado y el flujo de aire cerrado y finalmente se pesaron.

2.6 Ensayos de competitividad mediante detección del plásmido pGUS3, en plantas de alfalfa

El cultivo de plantas se llevó a cabo según la técnica descrita por Olivares *et al*. (1980). Para ello, se utilizaron tubos de vidrio (2 x 20 cm) en los que se añadieron 10 ml de solución nutritiva de plantas Rigaud y Puppo y se le colocó una tira de papel de filtro de forma vertical a lo largo de tubo. Los tubos preparados se autoclavaron a 121 ºC durante 20 minutos. En cada tubo se colocó una semilla de alfalfa germinada y se mantuvieron durante 48 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado este tiempo, la parte inferior de los tubos se envolvió en papel opaco para evitar la incidencia de la luz sobre las raíces y se pasaron a la cámara de cultivo de plantas donde estuvieron 7 días con una emisión de intensidad lumínica de 500 µE x m^{-2} x s^{-1} (λ = 400 – 700 nm), fotoperiodo 16/8 horas luz/oscuridad, temperatura de 24/18 ºC - día/noche y humedad relativa de un 50%.

La determinación del número de nódulos que una cepa es capaz de formar en presencia de otra se hizo utilizando cepas marcadas con el gen informador *gusA* (β-glucuronidasa). Pasados esos 7 días, cada planta fue inoculada con 1 ml de una suspensión de 1 x 10^6 células ml^{-1} que contenía en proporción 1:1 una mezcla de la cepa silvestre o la cepa de estudio, con la cepa silvestre marcada con el plásmido pGUS3. Una vez inoculados, se llevaron de nuevo a la cámara de plantas. 15 días después de la inoculación se cortaron las raíces, se aclararon con agua destilada entre 10 – 15 minutos y se mantuvieron sumergidas en 5 ml de una solución de X-Gluc, Thermo Scientific, (21 mg 40 ml^{-1}) en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7 y SDS al 1%, durante 20 - 22 horas a 37 ºC en oscuridad. Pasado este tiempo, los nódulos que contenían la cepa silvestre marcada con pGUS3 o estaban ocupados por ambas cepas aparecieron teñidos de azul, mientras que aquellos ocupados exclusivamente por la cepa de interés permanecieron blancos. Se

pudo establecer así la relación entre la capacidad de ocupación de los nódulos de la cepa de estudio y su parental.

Soluciones empleadas	
Tampón fosfato sódico	Na_2HPO_4 (100 mM) 14,4 ml; NaH_2PO_4 (100 mM) 10,6 ml; SDS 10% 5 ml; H_2O 25 ml; X-Gluc 26,25 mg

2.7 Ensayos de cinética de nodulación en plantas de alfalfa

Para cada tratamiento y repetición, se utilizaron 4 bolsas de crecimiento (*seed-pack growth pouches*) de Northrup King Co. (USA) a las que se añadió 12 ml de agua destilada. Cada grupo de 12 se envolvió con papel de aluminio y se esterilizó en autoclave a 120 ºC durante 15 min. Una vez frías, las bolsas se dispusieron en una gradilla especial (Northrup King Co., USA) que evitó que las bolsas se tocasen unas con otras, colocando 2 bolsas en cada extremo como protección frente a luz extrema y corrientes de aire.

Se esterilizaron las semillas de alfalfa (apartado 2.4) y se colocaron en condiciones asépticas en las bolsas de crecimiento (6 semillas/bolsa). A continuación, se inocularon con las distintas cepas de rizobios a razón de 200 µl semilla^{-1} de un cultivo previamente crecido a 10^8 rizobios ml^{-1}.

Las gradillas se colocaron en bandejas de plástico que contenían 1 l de agua destilada estéril, se taparon con film transparente, para evitar la deshidratación, y se mantuvieron en cámara de crecimiento (Sanyo Electric Co., Japan) a 15-25 ºC, 80% de humedad relativa, con un ciclo de luz- oscuridad de 12 h (4 LS) durante 30 días. El film transparente se retiró el cuarto o el quinto día, dependiendo del crecimiento de los tallos. Cada 7 días se añadieron 10 ml por bolsa de solución nutritiva de plantas Rigaud y Puppo y con una frecuencia de 2-3 días se observaron las raíces bajo lupa, para determinar el número de nódulos que iban apareciendo.

2.8 Ensayos de adhesión-colonización en plantas de alfalfa

El cultivo de plantas de alfalfa se realizó según el método de Olivares *et al*. (1980). previamente descrita en el apartado 2.7, modificada en i) se pusieron 5 semillas tubo^{-1} y ii) las plantas se inocularon a los 4 días de su colocación en los tubos con una suspensión de 10^6 células ml^{-1} de cada bacteria a testar. Se determinó el número de bacterias

adheridas a las raíces a diferentes tiempos: 0 (2 horas), 1, 2 y 3 días, siguiendo la metodología descrita en Jiménez-Zurdo *et al*. (1997), bien sonicando en un baño de ultrasonidos o bien rompiendo mecánicamente la raíz para separar las bacterias adheridas a la misma. Se analizaron un total de 15 plantas/tratamiento/tiempo (plantas correspondientes a 3 tubos). Las raíces de 5 plantas de cada tubo se lavaron juntas 3 veces con agua desionizada estéril y se introdujeron en un eppendorf de 2 ml conteniendo 1ml de tampón TE pH 8. Posteriormente, se procedió a la liberación de las bacterias íntimamente asociadas a la raíz mediante sonicación (2 x 1 minuto) en un baño de ultrasonido. Las bacterias liberadas se cuantificaron mediante recuento en placa de las colonias aparecidas tras sembrar diluciones seriadas del tampón en placas de MM con los antibióticos adecuados dependiendo de la estirpe. Los valores obtenidos se expresaron en UFC (unidades formadoras de colonias) por gramos de peso fresco de la raíz.

Solución empleada	
TE	Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8

RESULTADOS

Capítulo 1

Caracterización de rizobios aislados de nódulos de leguminosas que se desarrollan en suelos sometidos a estrés abiótico del Paraje Natural Marismas del Odiel y del Paisaje Protegido de Río Tinto

Zonas de muestreo

Se escogieron cuatro zonas de muestreo del Paraje Natural Marismas del Odiel y del Paisaje Protegido de Río Tinto muy diferentes entre sí, tanto por su historia como por las propiedades de sus suelos. Estas zonas y los puntos aproximados de muestreo se muestran en la Figura 1 y se describen a continuación

- Zona 2-1 "Arenal seco" y Zona 2-3 "Arenal inundado".

Ambas se corresponden con la zona más cercana al océano Atlántico, denominada Cabeza Alta, en el dique de Juan Carlos I. Estas zonas tienen influencias marina y del estuario conjunto de los ríos Tinto y Odiel. Se encuentran, aproximadamente, en la zona 5 del mapa (Figuras 13 y 14).

- Zona 3-1 "No recuperada" y Zona 3-2 "Recuperada".

Se encuentran en la misma área del Paraje Natural Marismas del Odiel, denominada Llanos de Bacuta (puntos 3 y 4 del mapa, Figura 1). En estas áreas, años atrás, se llevaron a cabo vertidos de lodos y sedimentos del río tras el dragado del Canal del Padre Santo, realizados para facilitar la entrada de barcos de mayor calado al Puerto

de Huelva. La zona "No recuperada" no ha sufrido ningún tratamiento desde entonces y quedó como zona testigo (zona con forma de riñón en la Figura 15 A) rodeada de una zona que fue sometida a tratamiento de recuperación.

Esta recuperación, consistió en la mejora de suelos mediante enmiendas calizas y orgánicas y posterior repoblación forestal con especies autóctonas, con diseño de estructuras en mosaico por agregados. Para la mejora del sustrato se dieron diversas labores en profundidad con enmiendas calizas y orgánicas para paliar y corregir el pH, la concentración de metales pesados, el grado de humedad, etc. y se introdujeron especies vegetales (22 especies autóctonas de arbolado y matorral) (Figura 15 B). Dentro de la repoblación forestal se dejó una parcela testigo sin enmiendas (a la que se ha llamado zona "No recuperada") para investigar la evolución natural de terreno. La zona "No recuperada" presenta una superficie de 123 hectáreas de marismas, alteradas por el depósito de lodos del dragado de la ría de Huelva, que originó la pérdida de su estructura natural, drenaje, vegetación, etc.; estos suelos se encontraban desnudos por las condiciones abióticas del sustrato (pH 4, metales pesados, salinidad, etc.) (Figura 15 C).

- Zona RT-2, cercana a la mina a cielo abierto de Río Tinto, en la Peña del Hierro, donde se encontraron algunas leguminosas.
- Zona RRT, (Ribera de Río Tinto), zona cercana al río donde abundaba *M. polymorpha*.

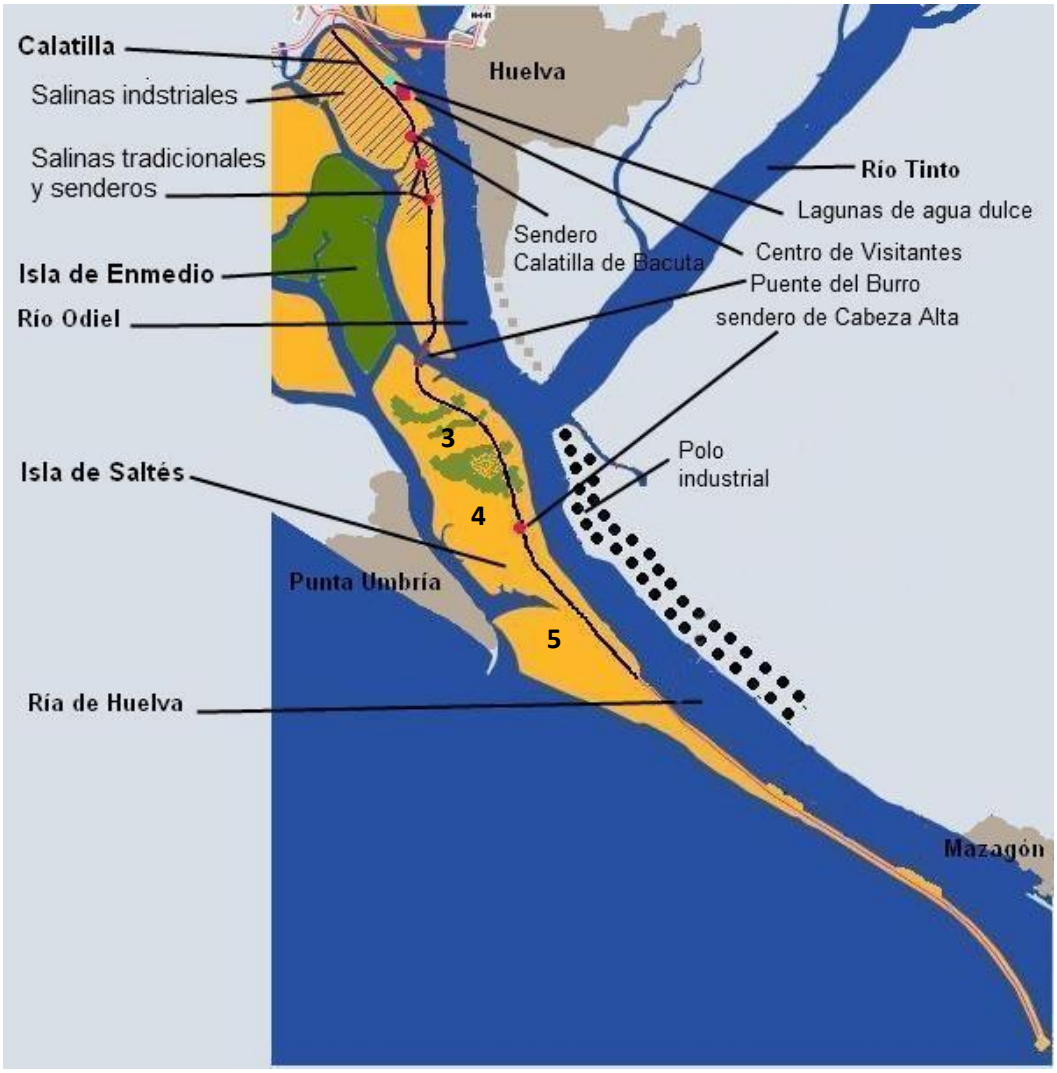


Figura 13. Mapa del Parque Natural Marismas del Odiel.

Figura 14. Vista aérea de la zona 2 y zona aproximada de los puntos de muestreo.

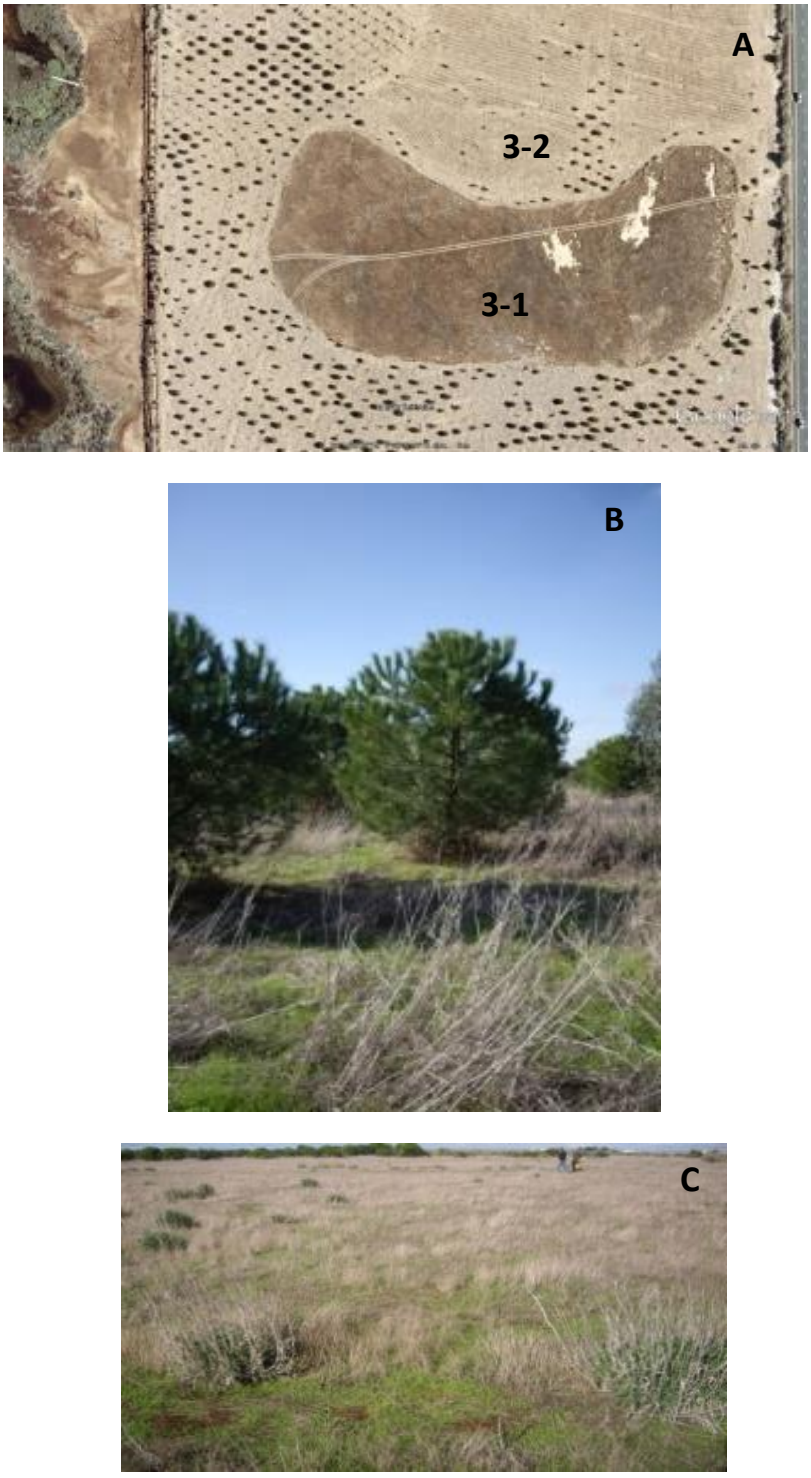


Figura 15. Imágenes de las zonas "Recuperada" y "No recuperada". A, La zona "No recuperada" se observa con forma de riñón y se dejó como testigo frente a los alrededores recuperados; B, Zona "Recuperada" y C, Zona "No recuperada".

1. Análisis físico-químico de los suelos de las áreas seleccionadas

Los análisis de suelos fueron realizados por el Servicio de Análisis del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC). Para ello se secaron y se enviaron 200 g de cada uno de los suelos y se les estudiaron los siguientes parámetros:

- pH
- Conductividad eléctrica (en extracto saturación) equivalente a la salinidad.
- Textura
- Materia Orgánica
- Nitrógeno por el método Kjeldahl
- Fósforo disponible
- C total, C orgánico y C inorgánico.

Se determinaron mediante ensayo y análisis por ICP (Inductively Coupled Plasma) los siguientes macro y microelementos, además de elementos traza: Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, S, Sr, V, Zn.

En las Tablas 6 y 7 se muestran los resultados de conductividad (medida indicativa de la salinidad), pH y textura de los suelos

Tabla 6. Conductividad y acidez de los suelos analizados.

ZONA	CE (Ext 1:5) (mS/cm)	pH (Ext 1:2,5)	
2-1 Arenal seco	0,044	8,01	Básico y no salino
2-3 Arenal inundado	1,86	8,22	Básico y salino
3-1 Zona no recuperada	2,60	4,14	Ácido y salino
3-2 Zona recuperada	0,333	7,78	Básico y no salino
RT2 Minas de Río Tinto	0,115	3,94	Ácido y no salino

Tabla 7. Textura de los suelos analizados.

ZONA	Arena fina (%)	Arena gruesa (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Clase textural
2-1 Arenal seco	0,5	99,5	0,0	0,0	Arenosa
2-3 Arenal inundado	0,5	97,8	1,1	0,5	Arenosa
3-1 Zona no recuperada	4,0	14,2	47,5	34,3	Franco-arcillo-limosa
3-2	4,7	21,1	46,2	28,0	Franco-arcillosa

Zona recuperada					
RT2 Minas de Río Tinto	8,4	44,2	23,6	23,7	Franco-arcillo-arenosa

De estos análisis se puede concluir que los puntos seleccionados para los primeros muestreos presentaron distintos tipos de estrés abiótico único o en combinación: alcalinidad, salinidad, acidez y acidez y salinidad. Por lo que son apropiados para realizar los futuros estudios de biodiversidad y hacerlos corresponder con estos parámetros físicoquímicos. Además, cabe destacar el menor valor de salinidad en el suelo "Recuperado" con respecto al "No recuperado".

En la Tabla 8 se describen los parámetros típicos de valoración de un suelo: fósforo, potasio, carbono orgánico, materia orgánica, nitrógeno total, nitrógeno orgánico y nitratos, así como la relación carbono/nitrógeno y la caliza total. Se puede observar que todos ellos son generalmente bajos o muy bajos en los suelos 2-1 del arenal seco de Odiel y RT-2 en Río Tinto. Sin embargo, en las zonas "Recuperada" y "No recuperada" estos valores son medios o altos. Cabe destacar el paralelismo en los valores de estos dos últimos suelos, en los que las diferencias observadas en pH y salinidad entre ambos, podrían atribuirse a la enmienda que se realizó sobre el recuperado.

En la Tabla 9 se muestran los datos obtenidos de los análisis de contenido en metales pesados y otros elementos de los suelos de las cinco zonas seleccionadas. Se muestran los resultados de Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, S, Sr, V y Zn. Para su descripción se han seguido los "Criterios y estándares" aplicados en Andalucía, publicados por Galán *et al.* (1999) y que se muestran en la Tabla 10, donde se resumen los umbrales de contaminación propuestos para los elementos traza. Los valores representan concentraciones totales y están expresados en mg/kg.

Según esos criterios, se puede decir que los suelos de las zonas 2-1 y 2-3, "Arenal seco" y "Arenal inundado", respectivamente, no presentaron valores de contaminación para los metales que se detallan en la Tabla 10. Los valores de los metales analizados y que se ajustaron a este criterio, aparecen con una A.

Los suelos 3-1 y 3-2, "No recuperado" y "Recuperado", respectivamente, presentaron valores de concentración de cobre diez veces superiores a los niveles de intervención en parques naturales (representado por dos rombos) y de arsénico, 3 veces

superiores (un rombo). Los valores de cinc y de plomo se encuentran entre los considerados de tratamiento obligatorio en parques naturales (D) y los niveles de mercurio, de investigación obligatoria (C).

Por último, en la zona RT-2 de las Minas de Río Tinto, el valor de concentración de arsénico fue tres veces superior al nivel de intervención en parques naturales, el de cobre fue de investigación obligatoria (C) y los de cromo, níquel y mercurio, de investigación recomendable (B).

De los valores de otros metales no contemplados en la tabla de Galán *et al.* (2009), se ha observado que la concentración de aluminio es 45 veces superior en las zonas "No recuperada" y "Recuperada" (3-1 y 3-2) con respecto a las de los arenales (2-1, 2-3) y está por encima de la encontrada en las minas de Río Tinto (RT-2). Los niveles de boro son aproximadamente 14 veces superiores en 3-1 y 3-2 con respecto a los de RT-2 y entre 5 y 17 veces superior a los de los arenales, 2-1 y 2-3. En el caso del bario, los valores fueron más de dos veces superiores en 3-1 y 3-2 que en RT-2 y en torno a 93 veces superior a los de las zonas de arenales 2-1 y 2-3. Y así sucesivamente, se observó que las concentraciones de metales en 3-1 y 3-2 fueron generalmente altas en comparación con RT-2 y extremadamente altas comparadas con las zonas de arenales 2-1 y 2-3, excepto en algunos casos como cromo o litio.

Por último, se realizó un análisis comparativo de los valores obtenidos en los suelos "No recuperado" (3-1) y "Recuperado" (3-2). Como se puede observar en la Tabla 6**,** los valores de concentración de los distintos metales fueron similares, pero sí se observaron diferencias en otros parámetros: los valores de fósforo Olsen (5,8 veces), el de potasio asimilable (1,55 veces), el de carbono orgánico oxidable (2,2 veces), el de materia orgánica (2,2 veces), fueron más altos en el suelo "Recuperado" frente al "No recuperado" (Tabla 11). Cabe destacar que el valor de concentración de sodio fue 3,7 veces mayor en el suelo "No recuperado" con respecto al "Recuperado". Estos distintos valores en los parámetros mencionados se pueden deber a los procesos de recuperación a los que se había sometido.

Tabla 8. Estudio de los parámetros de los suelos.

ZONA	Fósforo Olsen (mg/kg)	Potasio asimilable (mg/kg)	Carbono Orgánico oxidable (%)	Materia orgánica oxidable (%)	Nitrógeno Kjeldahl (%)	Nitrógeno orgánico estimado (%)	N-NO3 ppm	Relación C/N	Caliza Total (%)
2-1 Arenal seco Alcalino y no salino	4,6 Bajo	13,0 Muy bajo	0,262	0,45 Bajo	0,016 Bajo	0,032 Bajo	6	8,16 Bajo	5
2-3 Arenal inundado Alcalino y muy salino	6,8 Medio	77,0 Muy bajo	0,095	0,16 Bajo	0,010 Bajo	0,018 Bajo	0	5,28 Bajo	10
3-1 No recuperado Muy ácido y muy salino	6,8 Medio	346 Muy alto	1,48	2,55 Alto	0,160 Alto	0,135 Alto	56	11,0 Medio	0
3-2 Recuperado Alcalino y no salino	39,2 Alto	537 Muy alto	3,25	5,61 Alto	0,291 Alto	0,285 Alto	45	11,4 Alto	1
RT2 Minas RT Muy ácido y no salino	1,4 Bajo	37,0 Muy bajo	0,165	0,28 Bajo	0,029 Bajo	0,024 Bajo	0	6,90 Bajo	0

Tabla 9. Contenido en metales pesados y otros elementos de las zonas de estudio.

REGISTRO	Al	As	B	Ba	Ca	Cd	Co	Cr	Cu
	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg
Blanco	0,01393	-0,00137	-0,00112	-0,00463	0,11219	-0,00005	0,00055	-0,00058	0,00031
2-1 Arenal seco	1039,75635	A 11,99272	1,68168	4,10278	37869,8476	A 0,1302	A 2,86476	A 3,23166	A 29,22327
2-3 Arenal inundado	1275,33606	A 10,55028	4,67601	4,01684	60416,7148	A 0,0255	A 3,39340	A 3,23010	A 27,68631
3-1 No recuperado	52127,02734	♦513,07629	34,37137	376,61118	2644,17578	A 0,7472	A 13,50472	A 67,02094	♦♦1139,903
3-2 Recuperado	53388,37109	♦490,76782	23,48149	374,75601	19521,8300	A 0,8185	A 12,67099	A 68,28561	♦♦1120,171
RT2 Minas RT	45584,56641	♦308,24222	2,13405	126,38039	308,08746	A 0,6659	A 19,73673	B 211,6694	C293,8875

♦ ♦ 10 veces el valor de intervención en parques naturales; ♦ 3 veces el valor de intervención; **A**: no contaminado; **B** Investigación recomendable; **C**: Investigación obligatoria; **D**: Tratamiento obligatorio (nivel de intervención).

Tabla 9. Contenido en metales pesados y otros elementos de las zonas de estudio (continuación).

REGISTRO	Fe	Hg	K	Li	Mg	Mn	Na	Ni
	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg
Blanco	0,00305	-0,00078	-0,02465	0,00528	0,02531	0,00215	0,03626	-0,00032
2-1 Arenal seco	2995,70190	A -0,05087	198,62570	1,94308	517,92468	103,70766	457,89725	A 2,45288
2-3 Arenal inundado	2908,53320	A -0,05174	308,59692	1,48943	1115,83069	219,74083	1882,46399	A 2,66134
3-1 No recuperado	89390,67969	C 2,47528	5737,66846	56,06139	8280,01953	284,67880	2495,20996	A 31,32643
3-2 Recuperado	82298,75781	C 2,25766	7543,91650	54,26423	7260,92236	294,75220	671,22620	A 31,63733
RT2 Minas RT	109592,54688	B 1,82659	1069,85022	107,40145	8182,43750	744,93280	888,14056	B 75,68745

♦♦10 veces el valor de intervención en parques naturales; ♦3 veces el valor de intervención; **A**: no contaminado; **B** Investigación recomendable; **C**: Investigación obligatoria; **D**: Tratamiento obligatorio (nivel de intervención).

Tabla 9. Contenido en metales pesados y otros elementos de las zonas de estudio (continuación).

REGISTRO	P	Pb	S	Sr	V	Zn
	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg
Blanco	-0,00126	-0,00330	-0,13811	-0,00110	0,00014	-0,01245
2-1 Arenal seco	128,28735	A 6,52172	123,44010	213,69649	7,24173	A 88,68639
2-3 Arenal inundado	375,30414	A 5,52245	341,56680	357,01196	7,49350	A 73,20671
3-1 No recuperado	1457,62439	D 388,45276	5290,33984	45,49680	86,65114	D 874,46936
3-2 Recuperado	2083,45996	D 403,61801	1397,83203	54,50659	91,46986	D 75,04346
RT2 Minas RT	613,69800	169,44498	2543,71509	14,01931	142,84435	106,22494

♦ ♦ 10 veces el valor de intervención en parques naturales; ♦ 3 veces el valor de intervención; **A**: no contaminado; **B** Investigación recomendable; **C**: Investigación obligatoria; **D**: Tratamiento obligatorio (nivel de intervención).

Tabla 10. Criterios y estándares aplicados en Andalucía. Resumen de los umbrales de contaminación propuestos para elementos traza. Los valores representan concentraciones totales y están expresados en mg/kg (Galán *et al.*, 1999).

	Suelos Agrícolas											
Elemento	1		2_1		2_2		3			PN	AI	
	<7	>7	<7	>7	<7	>7	<7		>7			
As	<20		20-30		30-50		>50			>100	>300	
Cd	<2	<3	2-3	3-5	3-7	5-10	>7		>10	>15	>30	
Co	<20	<50	20-50	50-150	50-100	150-300	>100	>	300	>300	>400	
Cr	<100		100-250		250-450		>450			>500	>1000	
Cu	<50	<100	50-150	100-300	150-300	300-500	>300		>500	>500	>1000	
Hg	<1		1-2		2-10		>10			>15	>30	
Mo	<10		10-40		40-200		>200			>200	>500	
Ni	<40	<50	40-80	50-100	80-200	100-300	>200		>300	>500	>750	
Pb	<100	<200	100-250	200-400	250-350	400-500	>350		>500	>1000	>2000	
Se	<2		2-5		5-10		>10			>20	>30	
Sn	<20		20-50		50-150		>150			>300	>500	
Tl	<1		1-3		3-5		>5			>10	>30	
Zn	<200	<300	200-300	300-500	300-600	500-1000	>600		>1000	>1000	>3000	

(1) - Valores máximos permitidos; (2_1) - Investigación recomendable; (2_2) - Investigación obligatoria; (3)- Tratamiento necesario (obligatorio); (PN) = Valor de intervención para parques naturales y zonas forestales.; (AI) = Valor de intervención para áreas industriales ; (<7) = pH 5-7; (>7) = pH

Tabla 11. Comparación entre las zonas "Recuperada" y "No recuperada" de las Marismas del Odiel.

ZONA	Fósforo Olsen (mg/kg)	Potasio asimilable (mg/kg)	Carbono Orgánico oxidable (%)	Materia orgánica oxidable (%)	N Kjeldahl (%)	Nitrógeno orgánico estimad (%)	N-NO3 ppm	Relación C/N	Caliza Total (%)	Na mg/Kg	
3-1 No recuperado Muy ácido y muy salino	6,8 Medio	346 Muy alto	1,48	2,55 Alto	0,160 Alto	0,135 Alto	56	11,0 Medio	0	2490	Cu ♦♦ Zn D Pb D As ♦ Hg C
3-2 Recuperado Alcalino y no salino	39,2 Alto	537 Muy alto	3,25	5,61 Alto	0,291 Alto	0,285 Alto	45	11,4 Alto	1	671	Cu ♦♦ Zn D Pb D As ♦ Hg C

2. Aislamiento y determinación de los rizobios

En colaboración con el Laboratorio de Inoculantes del centro IFAPA Las Torres-Tomejil, se aislaron rizobios a partir de los nódulos de plantas de las zonas 3-2 "Recuperada" y 2-1 "Arenal seco" de las Marismas del Odiel, de la ribera del Río Tinto (RRT) y de minas de Río Tinto, RT-2. No se encontraron leguminosas con nódulos en la zona 3-1 "No recuperada" ni en la zona 2-3 "Arenal inundado". En total se aislaron 82 bacterias a partir de 132 nódulos.

Con objeto de eliminar las repeticiones entre las cepas aisladas y conocer la diversidad de rizobios presentes tanto en las Marismas del Odiel como en Río Tinto, se usaron técnicas de tipificación molecular basadas en la amplificación del ADN. Este grupo de técnicas, además de posibilitar la comparación entre aislamientos, permite conocer las relaciones existentes entre ellos. Se utilizó la técnica ERIC-PCR que se basa en el uso de cebadores complementarios a elementos consenso intergénicos reiterativos de enterobacterias, de un tamaño de 124-127 pb, que están muy conservados y que aparecen repetidos en los genomas bacterianos. Estas secuencias se encuentran en distintas posiciones a lo largo de todo el genoma, en ambas orientaciones y pueden servir como sitios de hibridación de cebadores para la amplificación de ADN, generando perfiles exclusivos para cada cepa bacteriana. Se amplificó el ADN de todos los aislamientos usando los cebadores ERIC1R y ERIC2 (Versalovic *et al*., 1991).

2.1 Selección de bacterias aisladas de nódulos de leguminosas de las áreas de las Marismas del Odiel y del paraje del Río Tinto en base a su perfil de ERIC-PCR

En la zona 3-2 "Recuperada", se aislaron bacterias de nódulos de *Lotus corniculatus* y *Ornithopus compressus*. Ejemplos de perfiles ERIC de algunos de estos aislamientos se muestran en las Figuras 16 A y 16 B. De ellos se escogieron únicamente aquellos aislamientos con perfiles diferentes, debido a que, como se ha indicado anteriormente, diferentes perfiles indicarían distintas estirpes bacterianas. De esta forma se elimina redundancia y se trabaja con estirpes diferentes.

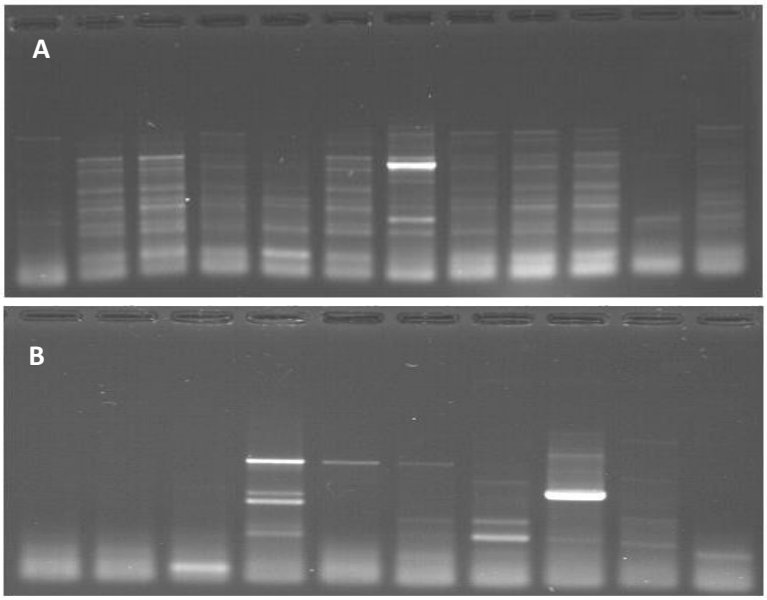


Figura 16. Perfiles ERIC**.** A, Perfiles correspondientes a aislamientos de *Lotus corniculatus* de la zona 3-2. B, Perfiles correspondientes a aislamientos de *Ornithopus compressus* de la zona 3-2.

En la zona 2-1 "Arenal seco" se aislaron bacterias de nódulos de *Medicago marina* y *Medicago* sp. Algunos de los perfiles ERIC correspondientes a los aislamientos de estas plantas, se pueden observar en las Figuras 17 A y 17 B.

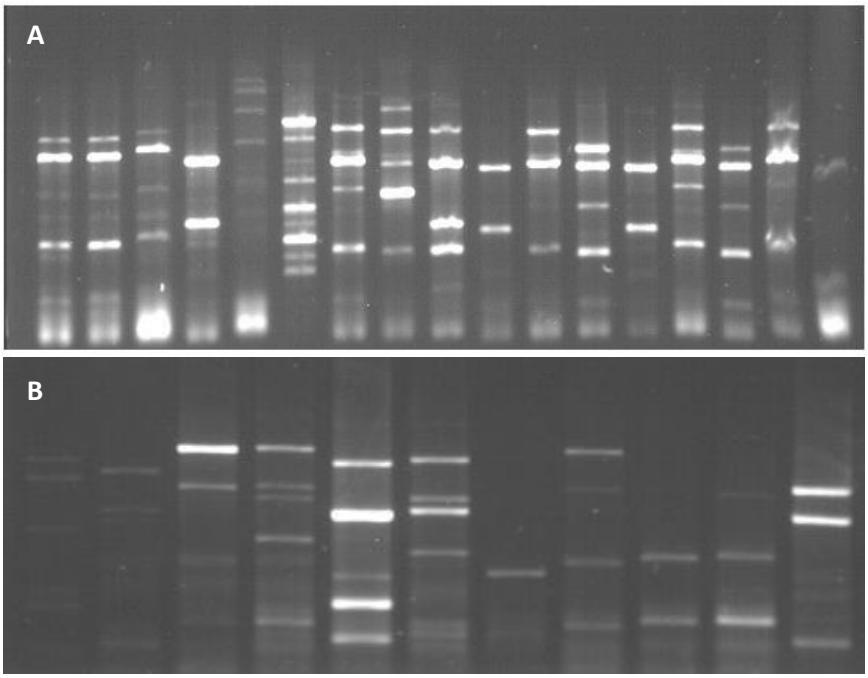


Figura 17. Perfiles ERIC. A, Perfiles correspondientes a aislamientos de *Medicago marina* de la zona 2-1; B, Perfiles correspondientes a aislamientos de *Medicago* sp. de la zona 2-1.

En la zona correspondiente a las Minas de Río Tinto (RT-2) apenas se encontraron leguminosas y sólo se obtuvieron aislamientos de *Trifolium* sp. En el caso de la Ribera del Río Tinto se obtuvieron aislamientos de *Medicago polymorpha*. En las Figuras 18 A y 18 B se muestran algunos perfiles ERIC de los aislamientos de las plantas de esta zona.

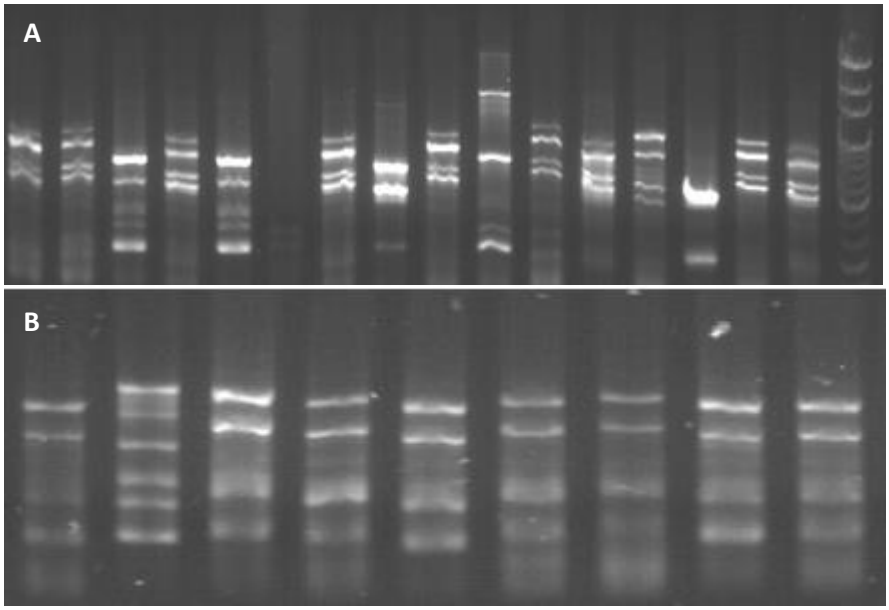


Figura 18. Perfiles ERIC. A, Perfiles correspondientes a aislamientos de *Trifolium* sp. de la zona RT2; B, Perfiles correspondientes a aislamientos de *Medicago polymorpha* de la zona RRT.

Tras la selección de los aislamientos con perfiles ERIC diferentes, se seleccionaron un total de 46 cepas que se recogen en la Tabla 12.

Tabla 12. Relación de aislamientos de nódulos de leguminosas de distintas zonas de las Marismas del Odiel y Río Tinto objeto de estudio. Se muestran las zonas y las plantas de aislamiento.

AISLAMIENTO	ZONA / PLANTA
ORT1	3-2 Recuperada/ *O. compressus*
ORT2	3-2 Recuperada/ *O. compressus*
ORT3	3-2 Recuperada/ *O. compressus*
ORT4	3-2 Recuperada/ *O. compressus*
ORT5	3-2 Recuperada/ *O. compressus*
ORT6	3-2 Recuperada/ *O. compressus*
ORT7	3-2 Recuperada/ *O. compressus*
ORT8	3-2 Recuperada/ *O. compressus*
ORT9	3-2 Recuperada/ *L. corniculatus*
ORT10	3-2 Recuperada/ *L. corniculatus*

AISLAMIENTO	ZONA / PLANTA
ORT11	2-1 Arenal seco/ *M. marina*
ORT12	2-1 Arenal seco/ *M. marina*
ORT13	2-1 Arenal seco/ *M. marina*
ORT14	2-1 Arenal seco/ *M. marina*
ORT16	2-1 Arenal seco/ *M. marina*
ORT17	2-1 Arenal seco/ *M. marina*
ORT18	2-1 Arenal seco/ *M. marina*
ORT19	2-1 Arenal seco/ *M. marina*
ORT20	2-1 Arenal seco/ *Medicago* sp.
ORT21	2-1 Arenal seco/ *Medicago* sp.
ORT22	2-1 Arenal seco/ *Medicago* sp.
ORT23	2-1 Arenal seco/ *Medicago* sp.
ORT24	2-1 Arenal seco/ *Medicago* sp.
ORT25	2-1 Arenal seco/ *Medicago* sp.
ORT26	2-1 Arenal seco/ *Medicago* sp.
ORT27	2-1 Arenal seco/ *Medicago* sp.
ORT28	2-1 Arenal seco/ *Medicago* sp.
ORT29	RT-2 Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.
ORT30	RT-2 Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.
ORT31	RT-2 Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.
ORT32	RT-2 Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.
ORT33	RT-2 Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.
ORT35	RT-2 Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.
ORT38	RT-2 Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.
ORT39	RT-2 Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.
ORT40	RT-2 Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.
ORT41	RT-2 Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.
ORT42	RT-2 Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.
ORT43	RT-2 Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.
ORT44	RT-2 Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.
ORT45	RT-2 Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.
ORT46	RT-2 Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.

AISLAMIENTO	ZONA / PLANTA
ORT47	RRT Minas Río Tinto/ *M. polymorpha*
ORT48	RRT Minas Río Tinto/ *M. polymorpha*
ORT49	RRT Minas Río Tinto/ *M. polymorpha*
ORT50	RRT Minas Río Tinto/ *M. polymorpha*

2.2 Amplificación del gen *nodC.*

Con el objeto de verificar que todos los aislamientos eran rizobios y no otros tipos bacterianos que pudieron penetrar en el nódulo conjuntamente con éstos, a las 47 cepas se les amplificó el gen *nodC* mediante PCR y por triplicado, usando cebadores universales degenerados (nodCF y nodCI, descritos por Laguerre *et al.,* 2001) y usando como control positivo *Rizobium tropici* CIAT 899. No se consiguió amplificar el gen *nodC* de los aislamientos ORT1 a ORT10 correspondientes a las plantas *Ornithopus compressus* y *Lotus corniculatus* de la zona "Recuperada" de las Marismas del Odiel, así como tampoco amplificó el aislamiento ORT14 de *Medicago marina* del "Arenal seco" (2-1) de las Marismas del Odiel, ni el ORT30 de *Trifolium* sp. de las minas de Río Tinto (RT-2). Del mismo modo, en esta zona tampoco amplificaron los aislamientos ORT48, ORT49 y ORT50 de *Medicago polymorpha*. Los aislamientos de *Ornithopus compressus* y de *Lotus corniculatus,* de crecimiento lento y de morfología bastante similar a las bacterias del género *Bradyrhizobium*, no amplificaron el gen *nodC* a pesar de que sí lo hizo *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. Por tanto, fue necesario hacer ensayos de nodulación de estas bacterias en la misma especie o similar a la planta de la que se había aislado, antes de descartar que se tratase de rizobios

2.3 Caracterización simbiótica

Los ensayos de nodulación se llevaron a cabo en colaboración con el Centro IFAPA Las Torres-Tomejil y los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno de los aislamientos en su planta de origen o similar.

AISLAMIENTO	PLANTA DE AISLAMIENTO	NODULACIÓN EN PLANTA
ORT1	*O. compressus*	Nod$^+$, Fix$^+$ en *O. compressus* Nod$^+$, Fix$^-$ en *L. corniculatus*
ORT2	*O. compressus*	Nod$^+$, Fix$^+$ en *O. compressus* Nod$^+$, Fix$^-$ en *L. corniculatus*

AISLAMIENTO	PLANTA DE AISLAMIENTO	NODULACIÓN EN PLANTA
ORT3	*O. compressus*	Nod⁺, Fix⁺ en *O. compressus* Nod⁺, Fix⁻ en *L. corniculatus*
ORT4	*O. compressus*	Nod⁺, Fix⁺ en *O. compressus* Nod⁺, Fix± en *L. corniculatus*
ORT5	*O. compressus*	Nod⁺, Fix⁺ en *O. compressus* Nod⁺, Fix⁺ en *L. corniculatus*
ORT6	*O. compressus*	Nod⁺, Fix⁺ en *O. compressus* Nod⁺, Fix⁺ en *L. corniculatus*
ORT7	*O. compressus*	Nod⁺, Fix⁺ en *O. compressus* Nod⁺, Fix⁺ en *L. corniculatus*
ORT8	*O. compressus*	Nod⁺, Fix⁺ en *O. compressus* Nod⁺, Fix± en *L. corniculatus*
ORT9	*L. corniculatus*	Nod⁺, Fix⁻ en *L. corniculatus* *Nod⁺, Fix⁺ en* en *O. compressus*
ORT10	*L. corniculatus*	Nod⁺, Fix⁺ en *L. corniculatus* *Nod⁺, Fix⁺ en* en *O. compressus*
ORT11	*M. marina*	Nod⁺, Fix⁺ en *M. sativa* Nod⁺, Fix⁻ en *M. polymorpha*
ORT12	*M. marina*	Nod⁺, Fix⁺ en *M. sativa* Nod⁺, Fix⁻ en *M. polymorpha*
ORT13	*M. marina*	Nod⁺, Fix⁺ en *M. sativa* Nod⁺, Fix⁻ en *M. polymorpha*
ORT14	*M. marina*	Nod⁻ en *M. sativa* Nod⁻ en *M. polymorpha*
ORT15	*M. marina*	Nod⁺, Fix⁺ en *M. sativa* Nod⁺, Fix⁻ en *M. polymorpha*
ORT16	*M. marina*	Nod⁺, Fix⁺ en *M. sativa* Nod⁺, Fix⁻ en *M. polymorpha*
ORT17	*M. marina*	Nod⁺, Fix⁺ en *M. sativa* Nod⁺, Fix⁻ en *M. polymorpha*
ORT18	*M. marina*	Nod⁺, Fix⁺ en *M. sativa* Nod⁺, Fix⁻ en *M. polymorpha*
ORT19	*M. marina*	Nod⁺, Fix⁺ en *M. sativa* Nod⁺, Fix⁻ en *M. polymorpha*
ORT20	*Medicago* sp.	Nod⁺, Fix⁺ en *M. sativa* Nod⁺, Fix⁻ en *M. polymorpha*
ORT21	*Medicago* sp.	Nod⁺, Fix⁺ en *M. sativa* Nod⁺, Fix⁻ en *M. polymorpha*
ORT22	*Medicago* sp.	Nod⁺, Fix⁺ en *M. sativa* Nod⁺, Fix⁻ en *M. polymorpha*
ORT23	*Medicago* sp.	Nod⁺, Fix⁺ en *M. sativa* Nod⁺, Fix⁻ en *M. polymorpha*
ORT24	*Medicago* sp.	Nod⁺, Fix⁺ en *M. sativa* Nod⁺, Fix⁻ en *M. polymorpha*
ORT25	*Medicago* sp.	Nod⁺, Fix⁺ en *M. sativa* Nod⁺, Fix⁻ en *M. polymorpha*

AISLAMIENTO	PLANTA DE AISLAMIENTO	NODULACIÓN EN PLANTA
ORT26	*Medicago* sp.	Nod$^+$, Fix$^+$ en *M. sativa* Nod$^+$, Fix$^-$ en *M. polymorpha*
ORT27	*Medicago* sp.	Nod$^+$, Fix$^+$ en *M. sativa* Nod$^+$, Fix$^-$ en *M. polymorpha*
ORT28	*Medicago* sp.	Nod$^+$, Fix$^+$ en *M. sativa* Nod$^+$, Fix$^-$ en *M. polymorpha*
ORT29	*Trifolium* sp.	Nod$^+$, Fix$^+$ en *Trifolium repens*
ORT30	*Trifolium* sp.	Nod$^+$, Fix$^+$ en *T. repens*
ORT31	*Trifolium* sp.	Nod$^+$, Fix$^-$ en *T. repens*
ORT32	*Trifolium* sp.	Nod$^+$, Fix$^+$ en *T. repens*
ORT33	*Trifolium* sp.	Nod$^+$, Fix$^+$ en *T. repens*
ORT35	*Trifolium* sp.	Nod$^+$, Fix$^+$ en *T. repens*
ORT38	*Trifolium* sp.	Nod$^+$, Fix$^-$ en *T. repens*
ORT39	*Trifolium* sp.	Nod$^+$, Fix$^+$ en *T. repens*
ORT40	*Trifolium* sp.	Nod$^+$, Fix$^+$ en *T. repens*
ORT41	*Trifolium* sp.	Nod$^+$, Fix$^-$ en *T. repens*
ORT42	*Trifolium* sp.	Nod$^+$, Fix$^+$ en *T. repens*
ORT43	*Trifolium* sp.	Nod$^+$, Fix$^-$ en *T. repens*
ORT44	*Trifolium* sp.	Nod$^+$, Fix$^+$ en *T. repens*
ORT45	*Trifolium* sp.	Nod$^+$, Fix$^+$ en *T. repens*
ORT46	*Trifolium* sp.	Nod$^+$, Fix$^+$ en *T. repens*
ORT47	*M. polymorpha*	Nod$^+$, Fix$^+$ en *M. polymorpha*
ORT48	*M. polymorpha*	Nod$^-$ en *M. polymorpha*
ORT49	*M. polymorpha*	Nod$^-$ en *M. polymorpha*
ORT50	*M. polymorpha*	Nod$^-$ en *M. polymorpha*

Tras este análisis se corroboró que efectivamente los aislamientos de *O. compressus* y *L. corniculatus* son rizobios y que los aislamientos ORT14, ORT48, ORT49 y ORT50, que no amplificaron el gen *nodC*, no presentaban morfología característica de rizobio ni nodularon sobre la planta de la que fueron aislados, por lo que debe tratarse de otro tipo de bacterias que pudieron penetrar en el nódulo conjuntamente con los rizobios.

3. Rango de crecimiento con NaCl

Se estudió la capacidad de crecimiento de los distintos aislamientos a las concentraciones de 300 y 450 mM de NaCl en medio YM líquido a pH 7. En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 14. Capacidad de crecimiento de los aislamientos con 300 y 450 mM de NaCl.

AISLAMIENTO	ZONA / PLANTA	NaCl 300 mM	NaCl 450 mM
ORT1	Recuperada/ *O.compressus*	-	-
ORT2	Recuperada/ *O. compressus*	-	-
ORT3	Recuperada/ *O. compressus*	-	-
ORT4	Recuperada/ *O. compressus*	-	-
ORT5	Recuperada/ *O. compressus*	-	-
ORT6	Recuperada/ *O. compressus*	-	-
ORT7	Recuperada/ *O. compressus*	-	-
ORT8	Recuperada/ *O. compressus*	-	-
ORT9	Recuperada/ *L. corniculatus*	-	-
ORT10	Recuperada/ *L. corniculatus*	-	-
ORT11	Arenal seco/ *M. marina*	-	-
ORT12	Arenal seco/ *M. marina*	+	+
ORT13	Arenal seco/ *M. marina*	+	+
ORT16	Arenal seco/ *M. marina*	+	+
ORT17	Arenal seco/ *M. marina*	+	+
ORT18	Arenal seco/ *M. marina*	+	+
ORT19	Arenal seco/ *M. marina*	+	+
ORT20	Arenal seco/ *Medicago* sp.	+	+
ORT21	Arenal seco/ *Medicago* sp.	+	+
ORT22	Arenal seco/ *Medicago* sp.	+	+
ORT23	Arenal seco/ *Medicago* sp.	+	+
ORT24	Arenal seco/ *Medicago* sp.	+	-
ORT25	Arenal seco/ *Medicago* sp.	+	+
ORT26	Arenal seco/ *Medicago* sp.	+	-
ORT27	Arenal seco/ *Medicago* sp.	+	+
ORT28	Arenal seco/ *Medicago* sp.	+	+

AISLAMIENTO	ZONA / PLANTA	NaCl 300 mM	NaCl 450 mM
ORT29	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	+	+
ORT31	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	-
ORT32	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	-
ORT33	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	-
ORT35	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	-
ORT38	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	-
ORT39	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	-
ORT40	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	-
ORT41	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	-
ORT42	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	-
ORT43	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	-
ORT44	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	-
ORT45	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	-
ORT46	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	+	+
ORT47	Ribera Río Tinto/ *M. polymorpha*.	+	+

Así se comprobó, que los aislamientos de *Ornithopus compressus* y *Lotus corniculatus* no crecieron a concentraciones de NaCl de 300 mM, al igual que la mayor parte de los aislamientos de *Trifolium* sp. ya que únicamente ORT29 y ORT46 crecieron con NaCl; sin embargo, prácticamente todos los aislamientos de *M. marina*, *Medicago* sp. y *M. polymorpha* crecieron sin dificultad a 300 mM de NaCl, con la única excepción de ORT11 y todos ellos excepto tres (ORT11, ORT24 y ORT26) crecieron también a 450 mM de NaCl en el medio de cultivo.

4. Rango de crecimiento a distintos pH

Al igual que en el caso del NaCl, es de especial interés conocer la capacidad de crecimiento de los aislamientos de rizobios a distintos pH. Se ensayaron los valores de pH de 5; 5,5; 7; 8 y 8,5 en medio YM líquido tamponado. Los resultados se pueden observar en la Tabla 15.

Tabla 15. Capacidad de crecimiento de los aislamientos a diferentes valores de pH.

AISLAMIENTO	ZONA / PLANTA	pH5	pH5,5	pH7	pH8	pH8,5
ORT1	Recuperada/*O.compressus*	-	+	+	+	-
ORT2	Recuperada/ *O. compressus*	-	-	+	+	+
ORT3	Recuperada/ *O. compressus*	-	-	+	+	-
ORT4	Recuperada/ *O. compressus*	-	-	+	+	-
ORT5	Recuperada/ *O. compressus*	-	-	+	-	-
ORT6	Recuperada/ *O. compressus*	-	-	+	+	-
ORT7	Recuperada/ *O. compressus*	-	+	+	-	-
ORT8	Recuperada/ *O. compressus*	-	-	+	+	-
ORT9	Recuperada/ *L.corniculatus*	-	-	+	-	-
ORT10	Recuperada/ *L. corniculatus*	-	-	+	+	-
ORT11	Arenal seco/ *M. marina*	-	+	+	+	+
ORT12	Arenal seco/ *M. marina*	-	+	+	+	+
ORT13	Arenal seco/ *M. marina*	-	+	+	+	+
ORT16	Arenal seco/ *M. marina*	-	+	+	+	+
ORT17	Arenal seco/ *M. marina*	-	+	+	+	+
ORT18	Arenal seco/ *M. marina*	-	+	+	+	+
ORT19	Arenal seco/ *M. marina*	-	+	+	+	+
ORT20	Arenal seco/ *Medicago* sp.	-	-	+	+	+
ORT21	Arenal seco/ *Medicago* sp,¡.	-	-	+	+	+
ORT22	Arenal seco/ *Medicago* sp.	-	-	+	+	+
ORT23	Arenal seco/ *Medicago* sp.	-	-	+	+	+
ORT24	Arenal seco/ *Medicago* sp.	-	-	+	+	+
ORT25	Arenal seco/ *Medicago* sp.	-	-	+	+	+
ORT26	Arenal seco/ *Medicago* sp.	-	-	+	+	+
ORT27	Arenal seco/ *Medicago* sp.	-	-	+	+	+
ORT28	Arenal seco/ *Medicago* sp.	-	-	+	+	+
ORT29	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	+	+	+	+
ORT31	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	-	+	+	+
ORT32	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	+	+	+	+
ORT33	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	+	+	+	+

AISLAMIENTO	ZONA / PLANTA	pH5	pH5,5	pH7	pH8	pH8,5
ORT35	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	+	+	+	+
ORT38	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	+	+	+	+
ORT39	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	+	+	+	+
ORT40	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	+	+	+	+
ORT41	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	+	+	+	+
ORT42	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	+	+	+	+
ORT43	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	-	+	+	+
ORT44	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	+	+	+	+
ORT45	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	+	+	+	+
ORT46	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	-	+	+	+	+
ORT47	Ribera Río Tinto/ *M. polymorpha*.	-	+	+	+	+

Los aislamientos de *O. compressus* y *L. corniculatus* crecieron en un rango de pH 7 a 8, excepto ORT1 cuyo rango fue desde 5,5 a 8; ORT2 que toleró mejor el pH básico y creció entre pH 7 y 8,5; ORT5 y ORT9 que únicamente crecieron a pH neutro y ORT7 cuyo rango osciló entre 5,5 y 7. Por otro lado, todos los aislamientos de *M. marina* crecieron en un amplio rango de pH desde 5,5 hasta 8,5; al igual que en el caso del aislamiento de *M. polymorpha,* ORT47. Sin embargo, los aislamientos de *Medicago* sp. no soportaron el pH ácido, creciendo únicamente a pH entre 7 y 8,5. Finalmente, la mayoría de los aislamientos de *Trifolium* sp. crecieron a pH entre 5,5 y 8,5, excepto ORT31 y ORT43 que no crecieron a pH 5,5.

5. Produccion de acil homoserina lactonas (AHL)

Se estudió la producción de acil homoserina lactonas (AHL) de todos los aislamientos mediante la detección de estos compuestos por la bacteria biosensora *Agrobacterium tumefaciens* NT1 pZLR4 (Cha *et al*., 1998). La mayor parte de los aislamientos produjeron estas moléculas implicadas en fenómenos de *quorum sensing*. De todos los aislamientos de la zona "Recuperada" solamente la cepa ORT1 no produjo AHL,

por otra parte, todos los aislamientos de *M. marina* y prácticamente todos los aislamientos de *Medicago* sp. produjeron AHL, en este caso, la excepción fue la estirpe ORT20. Entre los aislamientos de la zona de "Minas de Río Tinto" y "Ribera de Río Tinto" la producción de esos compuestos fue prácticamente generalizada ya que el único aislamiento que no las produjo fue ORT46.

6. Propiedades promotoras del crecimiento vegetal

Se analizaron algunas propiedades promotoras del crecimiento vegetal (PGP) en estos aislamientos independientemente de su capacidad simbiótica, como la producción de AIA y la solubilización de fosfatos.

6.1 Producción de ácido indol-acético (AIA) y solubilización de fosfatos

La producción de AIA, un análogo de hormona vegetal producido por algunas bacterias estimula el crecimiento radicular. Por otro lado, los fosfatos frecuentemente no están en forma soluble disponible para la planta, por ello, la capacidad de la bacteria para solubilizarlos y hacerlos disponibles para la planta es de gran importancia. La producción de ácido indol-acético y la capacidad para solubilizar fosfatos se han estudiado en todos los aislamientos y los resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Producción de AIA y capacidad solubilizadora de fosfatos.

AISLAMIENTO	ZONA / PLANTA	AIA µg/ml	SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS
ORT1	Recuperada/ *O. compressus*	3,36	-
ORT2	Recuperada/ *O. compressus*	2,71	-
ORT3	Recuperada/ *O. compressus*	2,05	-
ORT4	Recuperada/ *O. compressus*	2,38	-
ORT5	Recuperada/ *O. compressus*	2,38	+
ORT6	Recuperada/ *O. compressus*	2,05	+
ORT7	Recuperada/ *O. compressus*	2,71	+
ORT8	Recuperada/ *O. compressus*	2,05	-
ORT9	Recuperada/ *L. corniculatus*	2,05	-

AISLAMIENTO	ZONA / PLANTA	AIA µg/ml	SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS
ORT10	Recuperada/ *L. corniculatus*	2,05	-
ORT11	Arenal seco/ *M. marina*	3,04	(+)
ORT12	Arenal seco/ *M. marina*	14,47	(+)
ORT13	Arenal seco/ *M. marina*	17,09	-
ORT16	Arenal seco/ *M. marina*	18,39	-
ORT17	Arenal seco/ *M. marina*	8,92	+
ORT18	Arenal seco/ *M. marina*	10,88	+
ORT19	Arenal seco/ *M. marina*	3,04	(+)
ORT20	Arenal seco/ *Medicago* sp.	23,30	(+)
ORT21	Arenal seco/ *Medicago* sp.	13,82	(+)
ORT22	Arenal seco/ *Medicago* sp.	10,88	(+)
ORT23	Arenal seco/ *Medicago* sp.	23,62	(+)
ORT24	Arenal seco/ *Medicago* sp.	8,59	+
ORT25	Arenal seco/ *Medicago* sp.	6,96	+
ORT26	Arenal seco/ *Medicago* sp,.	6,96	(+)
ORT27	Arenal seco/ *Medicago* sp.	15,78	-
ORT28	Arenal seco/ *Medicago* sp.	3,36	(+)
ORT29	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	4,34	+
ORT31	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	9,25	(+)
ORT32	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	2,38	-
ORT33	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	5,65	-
ORT35	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	6,63	-
ORT38	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	4,34	+

AISLAMIENTO	ZONA / PLANTA	AIA µg/ml	SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATOS
ORT39	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	7,94	+
ORT40	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	11,21	(+)
ORT41	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	16,43	+
ORT42	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	8,59	(+)
ORT43	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	10,55	+
ORT44	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	4,67	+
ORT45	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	25,26	(+)
ORT46	Minas Río Tinto/ *Trifolium* sp.	7,94	+
ORT47	Ribera Río Tinto/ *M. polymorpha*.	3,36	(+)

(+) solubilización débil

Los aislamientos de *O. compressus* y *L. corniculatus*, de la zona "Recuperada" produjeron poco AIA y la mayor parte de ellos no solubilizó fosfatos, a diferencia de los aislamientos de *M. marina* y *Medicago* sp., del "Arenal seco", los cuales produjeron mayor cantidad de AIA y la mayoría de ellos solubilizó fosfatos. Por último, los aislamientos de *Trifolium* sp. y *M. polymorpha*, de Minas de Río Tinto y Ribera de Rio Tinto, produjeron AIA a diferentes cantidades y la mayor parte de ellos solubilizó fosfatos.

Los rizobios aislados de las leguminosas recolectadas de las distintas zonas de estudio mostraron gran diversidad en cuanto a la capacidad para crecer a altas concentraciones salinas, así como para soportar pH extremos, lo cual parece depender principalmente del tipo de rizobio y de la leguminosa de la que se han aislado, más que de las características del suelo. Entre todos ellos, fueron especialmente interesantes los aislamientos de *M. marina* por resistir mayores concentraciones de NaCl que el resto de aislamientos, además de crecer perfectamente en condiciones alcalinas. Por otro lado, hasta la fecha no se habían descrito los simbiontes de *M. marina,* por lo que resultó de gran interés su estudio y caracterización fisiológica y molecular.

Capítulo 2

Estudio fisiológico, molecular y simbiótico de los rizobios aislados de *Medicago marina* de poblaciones del suroeste de Andalucía.

El género *Medicago* comprende 80 especies de las que aproximadamente dos terceras partes son anuales y una tercera parte son perennes (Lesins y Lesins, 1979). Las especies de plantas hospedadoras de *E. meliloti* y *E. medicae* más estudiadas son *M. sativa* y *M. truncatula.* Sin embargo, *M. marina* es una planta realmente interesante que en España crece a lo largo de los sistemas dunares costeros por lo que posee un gran potencial para su empleo en la restauración y la estabilización de este tipo de ecosistemas. El interés en el estudio de los simbiontes de esta planta aumentó tras los resultados obtenidos en el primer capítulo de esta tesis, ya que los rizobios aislados de sus nódulos fueron tolerantes a altas concentraciones de NaCl y a pH alcalino, además de presentar propiedades para la promoción del crecimiento vegetal como la solubilización de fosfatos o la producción de AIA.

Además, hasta el momento, no se habían descrito los simbiontes de esta planta y, por tanto, se planteó hacer un amplio estudio genético, fisiológico y simbiótico de estas bacterias.

1. Aislamiento de rizobios de los nódulos de *M. marina*

Conocer las propiedades genéticas y la diversidad funcional de los aislamientos de plantas autóctonas puede servir para seleccionar inoculantes adecuados para las diversas condiciones que se pueden encontrar en el ambiente.

Los aislamientos de los nódulos de *M. marina* se obtuvieron a partir de dos poblaciones de la planta, una presente en las Marismas del Odiel (Huelva) y otra en las dunas de la playa de San Fernando (Cádiz). Se analizaron un total de 82 aislamientos de nódulos de ejemplares de esta planta recolectadas en ambas localizaciones. Todos fueron de crecimiento rápido puesto que las primeras colonias aparecieron en placas de YM con rojo Congo a las 48 horas desde su siembra.

1.1 Selección de bacterias aisladas de nódulos en base a su perfil de ERIC-PCR

Se analizó el perfil ERIC de los 82 aislamientos tras la amplificación mediante PCR utilizando los cebadores ERIC1R y ERIC2 (Versalovic *et al.*, 1991) y entre los que presentaban el mismo perfil, se realizó una selección al azar. Así, finalmente se seleccionaron 30 aislamientos con diferente perfil ERIC y que, por tanto, debían de corresponder a distintas estirpes.

2. Identificación de los aislamientos de *M. marina* a nivel de especie mediante análisis genético.

Tras obtener un número adecuado de aislamientos, fue necesario estudiar una serie de genes que habitualmente se toman como referencia para conocer la especie o especies a las que pertenecen dichos aislamientos. De esta forma se pueden clasificar y saber en qué contexto taxonómico se encuentran, información que es de gran utilidad para realizar un estudio exhaustivo.

2.1 Secuencia del gen ARNr 16S

El gen que codifica para el ARNr 16S de los 30 aislamientos fue amplificado mediante PCR usando los cebadores: 616F (Juretschko *et al.*, 1998) y 1522R (Edwards *et al.*, 1989) y posteriormente, secuenciado usando los cebadores; 519F (Lane *et al.*, 1985), 616F (Juretschko *et al.*, 1998), 907R (Muyzer *et al.*, 1997), 1522R (Edwards *et al.*, 1989). El análisis de las secuencias de este gen mostró que la mayor parte de ellos (29 de 30) presentaban

una similitud entre el 99,85 y el 100% con el gen ARNr 16S de *E. meliloti* LMG 6133^T. Únicamente el aislamiento SF3.41 mostró una similitud del 100% con la cepa tipo de la especie *E. medicae*, LMG 19920^T. Los resultados de los porcentajes de similitud obtenidos para cada estirpe se muestran en la Tabla 17. El árbol realizado mediante el algoritmo *neighbor-joining* con las secuencias obtenidas de cada uno de estos aislamientos se muestra en la Figura 19.

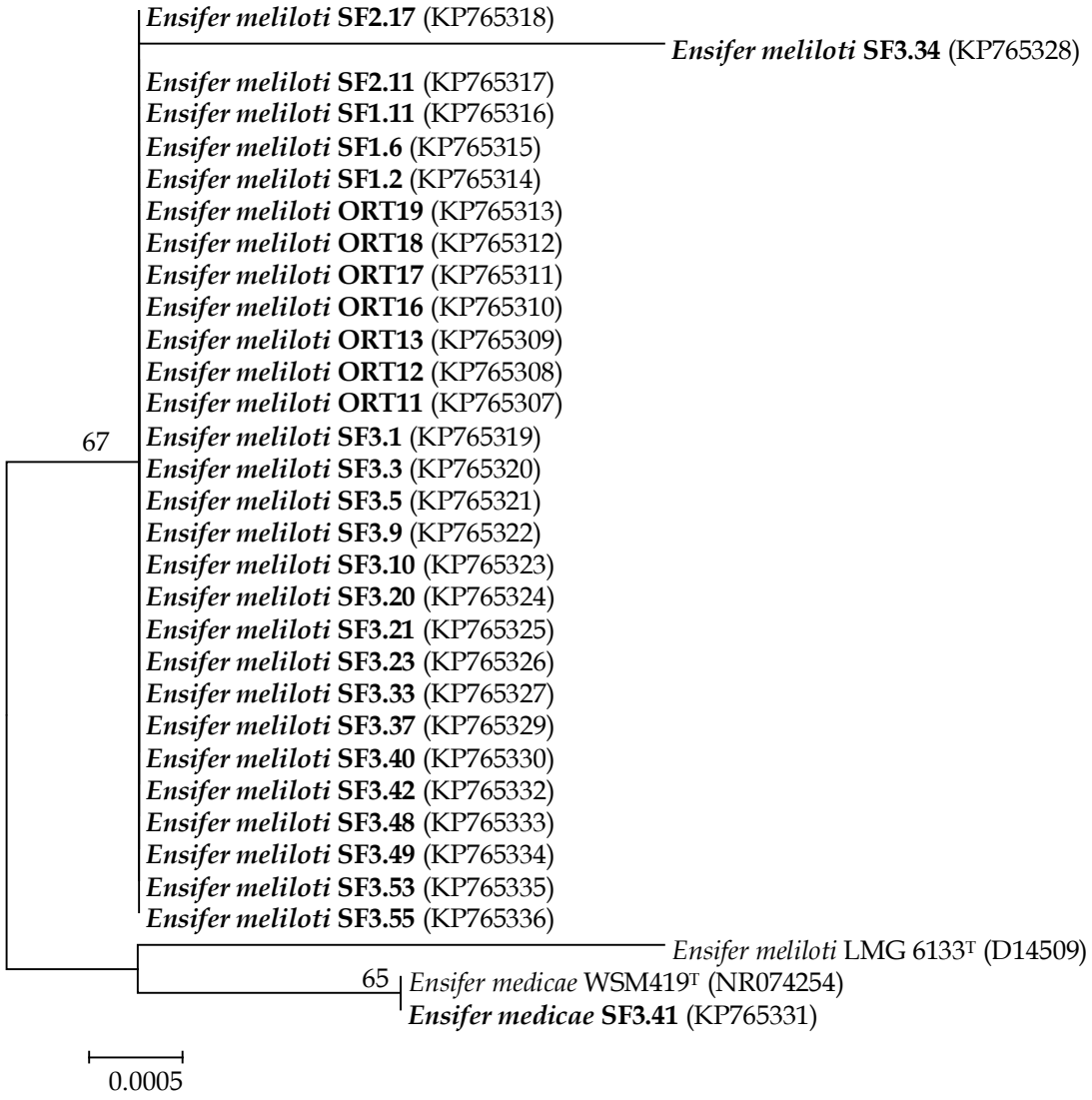


Figura 19. Árbol filogenético donde se aprecia la relación entre las secuencias del gen ARNr 16S de cada aislamiento con las de las cepas tipo de *E. meliloti* y *E. medicae*. Se muestran las cepas y los números de acceso a NCBI de todas las secuencias. Los valores de *bootstrap* representan los porcentajes obtenidos a partir de 1000 réplicas.

2.2 Perfil RFLP de la región intergénica IGS

Se amplificó la región intergénica IGS con los cebadores FGPS1490 (Navarro *et al.*, 1992) y FGPL132 (Ponsonnet y Nesme, 1994) y se analizó el perfil de restricción correspondiente a los 30 aislamientos, así como los de las dos estirpes tipo con dos enzimas, *Alu*I y *Msp*I. Todos los aislamientos, incluida la estirpe SF3.41, mostraron el mismo perfil al digerir con el enzima *Alu*I (tipo 1) que, además, coincidió con el perfil presentado por la cepa tipo *E. meliloti* LMG 6133^T. En el caso del perfil de restricción con el enzima *Msp*I, la mayor parte de los aislamientos presentaron un perfil común con el de la cepa tipo de *E. meliloti* (tipo 1). Hubo únicamente dos excepciones, la cepa SF3.41 cuyo perfil fue idéntico a la cepa tipo *E. medicae* LMG 19920^T (tipo 2) y la cepa ORT17 (tipo 3) que mostró un perfil único, diferente tanto a las dos cepas tipos como al resto de aislamientos. Los perfiles RFLP de la región IGS se muestran en la Figura 20. Los números asociados a cada perfil diferente se pueden ver en la Tabla 17.

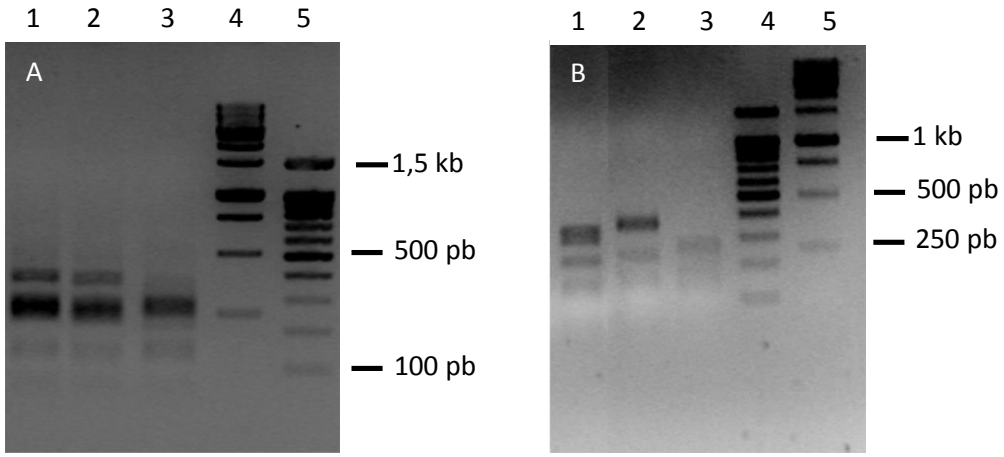


Figura 20. Perfiles RFLP de la región IGS digeridos con los enzimas *Alu*I y *Msp*I A, Perfiles de restricción con la enzima *Alu*I correspondientes a: carril 1, perfil obtenido para todos los aislamientos (tipo 1). Carril 2, perfil de *E. meliloti* LMG 6133^T. Carril 3, perfil de *E. medicae* LMG 19920^T (tipo 2). Carril 4, marcador de peso molecular de 1kb. Carril 5, marcador de peso molecular de 100 pb. B, Perfiles de restricción con la enzima *Msp*I correspondientes a: carril 1, ORT17 (tipo 3). Carril 2, *E. meliloti* LMG 6133^T y aislamientos exceptuando a ORT17 y a SF3.41 (tipo 1). Carril 3, *E. medicae* LMG 19920^T y SF3.41 (tipo 2). Carril 4, marcador de peso molecular de100 pb. Carril 5, marcador de peso molecular de 1kb.

2.3 Secuencia del gen *glnII*

El análisis de la secuencia del gen *glnII,* uno de los genes *housekeeping* empleados en los estudios taxonómicos de los rizobios, aporta información adicional a la del gen ARNr 16S. Por ello, se amplificó con los cebadores glnII12-F y glnII689-R (Vinuesa *et al*., 2005b) y se secuenció una región de 657 pb de dicho gen en una selección de 6 aislamientos, aquéllos que presentaban porcentajes de similitud con el gen ARNr 16S de *E. meliloti* LMG 6133^T por debajo del 100% (ORT17, ORT19, SF3.3, SF3.20, SF3.23, SF3.34) y SF 3.41, la única cepa con un 100% de identidad en el gen ARNr 16S con *E. medicae* LMG 19920^T. Además, también se llevó a cabo con algunos aislamientos cuyos porcentajes de identidad eran del 100% (ORT11, ORT12, SF1.2, SF3.10, SF3.33 y SF3.37) para tener datos representativos de todos los porcentajes del ARNr 16S. Todas las secuencias del gen *gln*II de los aislamientos de *M. marina* tuvieron una similitud del 99% con la del gen *glnII* de *E. meliloti* LMG 6133^T, excepto la secuencia del aislamiento SF3.41, cuyo porcentaje fue del 100% con la de la cepa tipo de *E. medicae.* Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 17. Así mismo, el árbol filogenético realizado con las secuencias de este gen en los aislamientos estudiados mediante el algoritmo *neighbor-joining* se muestra en la Figura 21; en él se observa como las cepas aparecen distribuidas en dos clados principales, el correspondiente a las cepas pertenecientes a *E. meliloti* en la parte superior y el correspondiente a las cepas de *E. medicae* en la parte inferior.

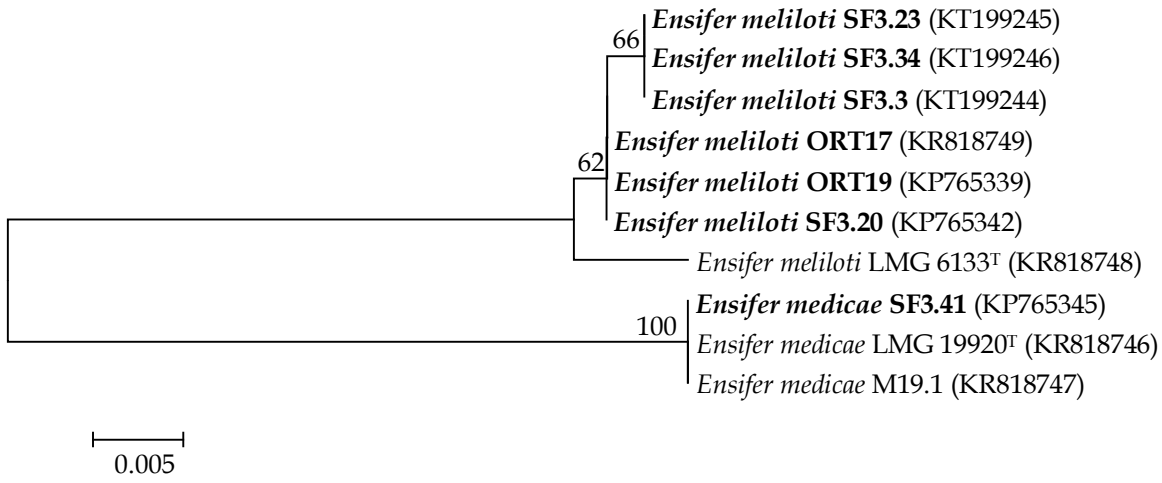


Figura 21. Árbol filogenético donde se aprecia la relación entre las secuencias del gen *glnII* de una serie de aislamientos seleccionados con la de las cepas tipo de *E. meliloti* y *E. medicae*. Se muestran las cepas y los números de acceso al NCBI de todas las secuencias. Los valores de "bootstrap" representan los porcentajes obtenidos a partir de 1000 réplicas.

Tabla 17. Grupos genéticos y perfiles RFLP de los aislamientos de *M. marina*

AISLAMIENTO	[a]Porcentaje de identidad del ADNr 16S (grupo)	[b] Grupo RFLP IGS		[c] Grupo *glnII*
		***Alu*I**	***Msp*I**	
ORT11	100% (1)	1	1	2
ORT12	100% (1)	1	1	2
ORT13	100% (1)	1	1	ND
ORT16	100% (1)	1	1	ND
ORT17	99,93% (2)	1	3	2
ORT18	100% (1)	1	1	ND
ORT19	99,93% (2)	1	1	2
SF1.2	100% (1)	1	1	2
SF1.6	100% (1)	1	1	ND
SF1.11	100% (1)	1	1	ND
SF2.11	100% (1)	1	1	ND
SF2.17	100% (1)	1	1	ND
SF3.1	100% (1)	1	1	ND
SF3.3	99,93% (2)	1	1	2
SF3.5	100% (1)	1	1	ND

AISLAMIENTO	[a]Porcentaje de identidad del ADNr 16S (grupo)	[b] Grupo RFLP IGS		[c] Grupo *glnII*
		***Alu*I**	***Msp*I**	
SF3.9	100% (1)	1	1	ND
SF3.10	100% (1)	1	1	2
SF3.20	99,92% (2)	1	1	2
SF3.21	100% (1)	1	1	ND
SF3.23	99,92% (2)	1	1	2
SF3.33	100% (1)	1	1	2
SF3.34	99,85% (2)	1	1	2
SF3.37	100% (1)	1	1	2
SF3.40	100% (1)	1	1	ND
SF3.41	100% (3)	1	2	3
SF3.42	100% (1)	1	1	ND
SF3.48	100% (1)	1	1	ND
SF3.49	100% (1)	1	1	ND
SF3.53	100% (1)	1	1	ND
SF3.55	100% (1)	1	1	ND
***E. meliloti* LMG 6133^T**	(1)	1	1	1
***E. medicae* LMG 19920^T**	(3)	2	2	3

Los resultados se indican de la siguiente forma:
[a] 1, 100% de identidad con *E. meliloti* LMG 6133^T; 2: identidad <100% con *E. meliloti* LMG 6133^T; 3, identidad del 100% con *E. medicae* LMG 19920^T.
[b] 1, perfil idéntico a *E. meliloti* LMG 6133^T; 2, perfil idéntico a *E. medicae* LMG 19920^T; 3, perfil único.
[c] 1, identidad del 100% con *E. meliloti* LMG 6133^T; 2, identidad del 99% con *E. meliloti* LMG 6133^T; 3, identidad del 99% con *E. medicae* LMG 19920^T.

3. Perfil de plásmidos

Los rizobios se caracterizan por presentar un número variable de plásmidos, uno de ellos es el simbiótico; por lo que fue de interés conocer el número plásmidos que presentaban los aislamientos de *M. marina*. El resultado obtenido tras el estudio del perfil de plásmidos mediante el método Eckhardt de cada uno de los 30 aislamientos fue bastante diverso tanto en número de plásmidos como en el tamaño de los mismos, mostrando que el perfil de plásmidos fue prácticamente único a nivel de estirpe. La

mayor parte de los aislamientos presentaron entre 2 y 3 plásmidos, mientras que otros presentaron entre 4 y 5. El número de plásmidos de cada aislamiento se puede ver en la Tabla 18.

4. Perfil de lipopolisacáridos (LPS)

Se llevó a cabo la extracción y el análisis mediante SDS-PAGE de los LPS de cada uno de los aislamientos. La mayoría de ellos presentaron un perfil electroforético de LPS similar al mostrado por *E. meliloti* LMG 6133^T, con la excepción de cuatro de ellos, ORT18 y SF3.41 y, por otro lado, SF3.21 y SF3.40 que presentaron ambos el mismo perfil. Cabe destacar que el perfil de SF3.41 no coincidiera con el de la cepa tipo *E. medicae* LMG 19920^T. El tipo de perfil que mostró cada aislamiento se muestra en la Tabla 18.

Tabla 18. Número de plásmidos y perfiles LPS de los aislamientos de *M. marina*

AISLAMIENTO	[a] Número de plásmidos	[b] Perfil LPS
ORT11	3	2
ORT12	2	2
ORT13	4	2
ORT16	2	2
ORT17	2	2
ORT18	4	3
ORT19	5	2
SF1.2	3	2
SF1.6	2	2
SF1.11	1	2
SF2.11	ND	2
SF2.17	3	2
SF3.1	3	2
SF3.3	3	2
SF3.5	3	2
SF3.9	3	2
SF3.10	2	2
SF3.20	4	2
SF3.21	2	4

AISLAMIENTO	[a] Número de plásmidos	[b] Perfil LPS
SF3.23	3	2
SF3.33	3	2
SF3.34	ND	2
SF3.37	2	2
SF3.40	2	4
SF3.41	1	5
SF3.42	3	2
SF3.48	3	2
SF3.49	4	2
SF3.53	3	2
SF3.55	2	2
***E. meliloti* LMG 6133^T**	2	2
***E. medicae* LMG 19920^T**	2	1

Los resultados se indican de la siguiente forma:
[a] Número de plásmidos, aunque el mismo número no conlleva necesariamente el mismo tamaño.
[b] Tipo de perfil de LPS mostrado: 1, 2, 3, 4 y 5.

5. Caracterización fisiológica

Para llevar a cabo una caracterización fisiológica completa de los aislamientos de *M. marina*, se estudió la capacidad para crecer en medio YM líquido a distintas concentraciones de NaCl y a distintos valores de pH en el mismo medio tamponado. Además, se estudió la capacidad de crecer en medio BM sólido con diferentes fuentes de carbono, en medio TY sólido a distintas temperaturas, además de la resistencia a distintas concentraciones de los antibióticos cloranfenicol, eritromicina, neomicina y vancomicina, entre otras pruebas.

5.1 Rango de crecimiento con NaCl

Todos los aislamientos de los nódulos de *M. marina* procedentes de las Marismas del Odiel crecieron en YM líquido a concentraciones de NaCl entre 300 y 800 mM al igual que las cepas tipo de *E. meliloti* y *E. medicae*. Sin ambargo, en los aislamientos de las dunas de San Fernando se encontró una mayor variabilidad, cinco de ellos (SF1.2, SF1.6, SF1.11, SF2.11 y SF2.17) tuvieron el mismo rango de crecimiento que los aislamientos de las

Marismas del Odiel (300 a 800 mM); la mayoría creció entre 300 y 700 mM, mientras que otros cuatro (SF3.3, SF3.5, SF3.21 y SF3.40) fueron los menos resistentes, creciendo como máximo a 600 mM. Los resultados se muestran en la Tabla 19.

5.2 Rango de crecimiento a distintos pH

Todos los aislamientos de *M. marina* procedentes de ambas zonas crecieron en medio líquido tamponado en un rango de pH entre 7 y 8,5, siendo claramente alcalino-tolerantes. De ellos, una gran parte crecieron además a pH ácido (5,5) siendo, por tanto, también ácido-tolerantes, como también demostraron ser las cepas tipo *E. meliloti* LMG 6133^T y *E. medicae* LMG 19920^T. Las excepciones fueron ORT16, SF3.1, SF3.5, SF3.10, SF3.23, SF3.40 y SF3.41, (Tabla 19).

5.3 Rango de crecimiento a distintas temperaturas

Todos los aislamientos de *M. marina* crecieron en placas de TY sólido a las temperaturas de 22, 28 y 37 ºC, incluida también la cepa tipo de *E. medicae*. Sin embargo, sólo un grupo de 11 aislamientos (ORT11, ORT13, ORT16, ORT17, ORT18, SF1.2, SF1.6, SF1.11, SF3.9, SF3.10 y SF3.40) crecieron a 42ºC, mientras que otros seis (ORT19, SF3.5, SF3.20, SF3.21, SF3.53 y SF3.55) lo hicieron levemente, al igual que la estirpe *E. meliloti* LMG 6133^T. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 19.

5.4 Asimilación de diferentes fuentes de carbono

Los aislamientos se comportaron de forma bastante diversa en cuanto a la asimilación de las diferentes fuentes de carbono. Ninguno de ellos creció con sorbosa como única fuente de carbono, mientras que todos lo hicieron con sorbitol, glicerol, D-salicina y manitol. El uso de otras fuentes de carbono como: arabinosa, dulcitol, D-galactosa, xilosa, ribosa, lixosa y melibiosa fue un carácter dependiente de la cepa. Así el 96,6% de las estirpes aisladas crecieron con D-galactosa, mientras que sólo el 6,6% de ellas lo hicieron con xilosa como única fuente de carbono; la capacidad de asimilación de las diferentes fuentes de carbono por cada aislamiento se puede observar en la Tabla 19.

5.5 Resistencia frente a diferentes antibióticos

Se realizó un estudio de la resistencia natural a los antibióticos cloranfenicol (Clm), eritromicina (Ery), neomicina (Neo) y vancomicina (Vam) en medio YM sólido. Los resultados obtenidos variaron, de modo que únicamente cinco de ellos (ORT17, SF1.6, SF3.9, SF3.40 y SF3.49) resistieron concentraciones de 15 µg/ml de vancomicina, mientras que todos los aislamientos excepto ORT17 y la cepa tipo *E. meliloti* LMG 6133^T crecieron con concentraciones de 60 µg/ml de cloranfenicol. Los resultados se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Características fisiológicas y capacidad de crecimiento en condiciones de estrés abiótico.

AISLAMIENTO	pH	NaCl (mM)	Antibiótico (µg/ml)					Fuente de Carbono						Crecimiento 42ºC
			Neo	Ery	Clm	Vam	Dul	D-Gal	Xil	Lix	Rib	Mel	Ara	
ORT11	5,5-8,5	300-800	30R	300R	60R	S	1	1	2	2	2	1	1	1
ORT12	5,5-8,5	300-800	S	150R	60R	S	1	1	2	2	2	2	2	2
ORT13	5,5-8,5	300-800	S	150R	60R	S	1	1	2	2	1	1	1	1
ORT16	7-8,5	300-800	S	S	60R	S	1	1	2	2	1	1	1	1
ORT17	5,5-8,5	300-800	15R	300R	S	15R	1	1	2	2	2	2	1	1
ORT18	5,5-8,5	300-800	15R	150R	60R	S	1	1	2	2	1	2	1	1
ORT19	5,5-8,5	300-800	15R	300R	60R	S	1	1	2	2	1	1	1	1*
SF1.2	5,5-8,5	300-800	30R	300R	60R	S	1	1	2	2	2	1	2	1
SF1.6	5,5-8,5	300-800	30R	300R	60R	15R	1	1	2	2	2	2	1	1
SF1.11	5,5-8,5	300-800	30R	S	60R	S	1	1	2	2	1	2	1	1
SF2.11	5,5-8,5	300-800	30R	S	60R	S	1	1	2	2	2	2	1	2
SF2.17	5,5-8,5	300-800	30R	300R	60R	S	1	1	2	2	1	2	1	2
SF3.1	7-8,5	300-700	30R	300R	60R	S	1	1	2	1	ND	ND	1	2
SF3.3	5,5-8,5	300-600	30R	300R	60R	S	1	1	2	1	ND	ND	1	2
SF3.5	7-8,5	300-600	60R	300R	60R	S	1	1	2	1	ND	ND	2	1*
SF3.9	5,5-8,5	300-700	S	150R	60R	15R	2	1	2	2	ND	ND	1	1
SF3.10	7-8,5	300-700	60R	300R	60R	S	1	1	1	1	ND	ND	1	1

AISLAMIENTO	pH	NaCl (mM)	Antibiótico (µg/ml)				Fuente de Carbono							Crecimiento 42ºC
			Neo	Ery	Clm	Vam	Dul	D-Gal	Xil	Lix	Rib	Mel	Ara	
SF3.20	5,5-8,5	300-700	30R	150R	60R	S	1	1	2	1	ND	ND	1	1*
SF3.21	5,5-8,5	300-600	S	S	60R	S	2	1	2	2	ND	ND	2	1*
SF3.23	7-8,5	300-700	60R	300R	60R	S	1	1	2	1	ND	ND	1	2
SF3.33	5,5-8,5	300-700	60R	300R	60R	S	2	1	2	1	ND	ND	1	2
SF3.34	5,5-8,5	300-700	15R	150R	60R	S	2	1	2	2	ND	ND	2	2
SF3.37	5,5-8,5	300-700	30R	150R	60R	S	2	1	2	2	ND	ND	2	2
SF3.40	7-8,5	300-600	30R	S	60R	15R	1	1	1	1	ND	ND	1	1
SF3.41	7-8,5	300-700	S	S	60R	S	1	2	2	2	ND	ND	2	2
SF3.42	5,5-8,5	300-700	60R	300R	60R	S	2	1	2	1	ND	ND	1	2
SF3.48	5,5-8,5	300-700	60R	300R	60R	S	1	1	2	1	ND	ND	1	2
SF3.49	5,5-8,5	300-700	30R	S	60R	15R	2	1	2	1	ND	ND	1	1
SF3.53	5,5-8,5	300-700	60R	300R	60R	S	1	1	2	1	ND	ND	1	1*
SF3.55	5,5-8,5	300-700	60R	300R	60R	S	2	1	2	2	ND	ND	2	1*
***E. meliloti* LMG 6133^T**	5,5-8,5	300-800	15R	S	S	S	1	1	2	2	2	1	1	1*
***E. medicae* LMG 19920^T**	5,5-8,5	300-800	S	S	60R	S	1	1	2	2	2	2	2	2

Los resultados se indican de la siguiente forma:
R: Resistente; S: Sensible y ND: No Determinado.
1: La estirpe crece en esta condición, 2: La estirpe no crece en esta condición, 1*: La estirpe crece lentamente en esta condición.

6. Rango de hospedador

Se realizaron ensayos de los 30 aislamientos de *M. marina* en siete especies de *Medicago*: *M. marina*, *M. minima*, *M. murex*, *M. orbicularis*, *M. polymorpha*, *M. sativa* y *M. truncatula.* Los resultados (Tabla 20) mostraron la gran variabilidad simbiótica que existe en estas estirpes, a pesar de que todas, excepto SF3.41, pertenecen a la misma especie. En *M. sativa* todos los aislamientos dieron lugar a nódulos fijadores excepto uno, SF3.48, cuyos nódulos eran ineficientes. Sin embargo, en *M. minima* y *M. polymorpha,* la mayor parte de los aislamientos formaron únicamente abultamientos en la raíz sin llegar a desarrollar nódulos propiamente dichos. Por otro lado, los resultados obtenidos en el resto de plantas fueron muy diversos: algunas estirpes formaron nódulos fijadores, otras formaron nódulos inefectivos para la fijación de nitrógeno, mientras que unas pocas únicamente produjeron abultamientos en la raíz. Cabe destacar que el aislamiento SF3.41 perteneciente a la especie *E. medicae* dio lugar a nódulos fijadores en todas las especies de *Medicago* probadas, así como también ocurrió con la estirpe M19.1, usada como cepa de referencia de *E. medicae* en los test de nodulación, ya que la cepa tipo LMG 19920^T no nodulaba o lo hacía muy tardía y débilmente.

Tabla 20. Nodulación y fijación de nitrógeno de los aislamientos de *M. marina* y las cepas de referencia en plantas de *M. sativa*, *M. polymorpha*, *M. truncatula*, *M. murex*, *M. orbicularis*, *M. minima* y *M. marina*.

AISLAMIENTO	***M. sativa***	***M. polymorpha***	***M. truncatula***	***M. murex***	***M. orbicularis***	***M. minima***	***M. marina***
ORT11	E	B	E	B	E	E	E
ORT12	E	B	B	B	I	E	E
ORT13	E	B	B	B	E	E	E
ORT16	E	B	I	B	I	I	E
ORT17	E	B	I	B	E	E	E
ORT18	E	B	I	B	E	E	E
ORT19	E	B	I	B	E	E	E
SF1.2	E	B	I	B	I	E	E
SF1.6	E	B	E	B	I	E	E
SF1.11	E	B	I	B	I	E	I
SF2.11	E	B	I	B	I	I	E

AISLAMIENTO	*M. sativa*	*M. polymorpha*	*M. truncatula*	*M. murex*	*M. orbicularis*	*M. minima*	*M. marina*
SF2.17	E	B	B	B	I	I	I
SF3.1	E	B	I	B	E	E	E
SF3.3	E	B	B	B	I	I	E
SF3.5	E	B	I	B	E	E	E
SF3.9	E	B	I	E	I	E	E
SF3.10	E	B	E	E	E	E	E
SF3.20	E	B	E	B	E	E	E
SF3.21	E	B	B	B	I	E	E
SF3.23	E	B	B	B	E	I	E
SF3.33	E	B	I	B	I	E	E
SF3.34	E	B	I	B	I	E	E
SF3.37	E	B	E	B	E	E	E
SF3.40	E	B	I	B	E	E	E
SF3.41	E	E	E	E	E	E	E
SF3.42	E	B	B	B	I	E	E
SF3.48	I	B	B	B	I	I	E
SF3.49	E	I	B	E	I	E	E
SF3.53	E	B	B	B	E	I	E
SF3.55	E	B	B	B	E	I	E
E. meliloti LMG 6133^T	E	B	B	B	I	E	I
E. medicae M19.1	E	E	E	E	I	E	E

E: Simbiosis efectiva (el peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas fue significativamente diferente de los controles sin inocular; P = 0,05). I: Simbiosis inefectiva (el peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas no fue significativamente distinto de los controles sin inocular; P = 0,05). B: Abultamientos en la raíz.

7. Nodulación en plantas de *M. marina*

Con el objetivo de determinar el rango de nodulación de *M. marin*a con otras especies del género *Ensifer*, se inocularon ocho de ellas, *E. americanus* CFNEI-156^T, *E. arboris* LMG 14919^T, *E. fredii* HH103, *E. kostiense* LMG 15613^T, *E. kummerowiae* CCBAU 71714^T, *E. morelense* LCO4^T, *E. saheli* LMG 7837^T y *E.* terangae LMG 7834^T en plántulas de *M. marina*, así como en *M. sativa* como control. Todas nodularon en *M.*

sativa pero únicamente *E. kummerowiae* CCBAU 71714^T noduló de forma eficiente las dos plantas, mientras que *E. kostiense* LMG 15613^T, *E. americanus* CFNEI-156^T y *E.* terangae LMG 7834^T solo fueron capaces de formar pequeños nódulos blancos sobre *M. marina*. Y las especies *E. arboris*, *E. fredii*, *E. morelense* y *E. saheli* no indujeron la formación de nódulos en esta planta.

8. Análisis filogenético de los genes simbióticos *nodC* y *nodA*

Teniendo en cuenta que los aislamientos de *M. marina* presentaron un comportamiento simbiótico bastante diverso sobre las distintas especies de *Medicago* probadas en contraposición con lo ocurrido en su planta de origen, donde la mayoría de ellos formaron nódulos eficientes, se decidió estudiar si pertenecían a diferentes simbiovariedades. Para ello se procedió a la secuenciación y análisis del gen *nodC*, que junto con *nodA* y *nodB* son los más empleados para este tipo de estudios.

Usando los cebadores nodC-F y nodC-R (Laguerre *et al*., 2001) se ha amplificado, secuenciado y analizado un fragmento de 780 pb del gen *nodC*, y se ha comparado con las secuencias del mismo gen de otras estirpes pertenecientes a las diferentes simbiovariedades de *E. meliloti*. El resultado mostró que todos los aislamientos identificados como *E. meliloti* compartían una secuencia del gen *nodC* bastante similar (99%) a la de la cepa *E. meliloti* ATCC 9930^T, perteneciente a la sv. meliloti. En la Figura 22 se representan únicamente algunos aislamientos representativos. Además, el aislamiento SF3.41 se relacionó con la cepa tipo *E. medicae* A321^T y otras estirpes de *E. medicae* que no pertenecen a ninguna simbiovaridad definida.

En el caso concreto de *E. meliloti*, algunas simbiovariedades están descritas por la secuencia de *nodA*, por lo que se ha amplificado mediante los cebadores nodAext-F y nodAext-R y secuenciado un fragmento de 695 pb de algunos aislamientos representativos, cuya relación con diferentes simbiovariedades de *E. meliloti* se puede ver en la Figura 23. En ella se aprecia que todos esos aislamientos se asemejan en la secuencia del gen *nodA* a la cepa tipo *E. meliloti* ATCC 9930^T perteneciente a la sv. meliloti, excepto el aislamiento SF3.41 cuya mayor relación se establece con la cepa *E. medicae* A3

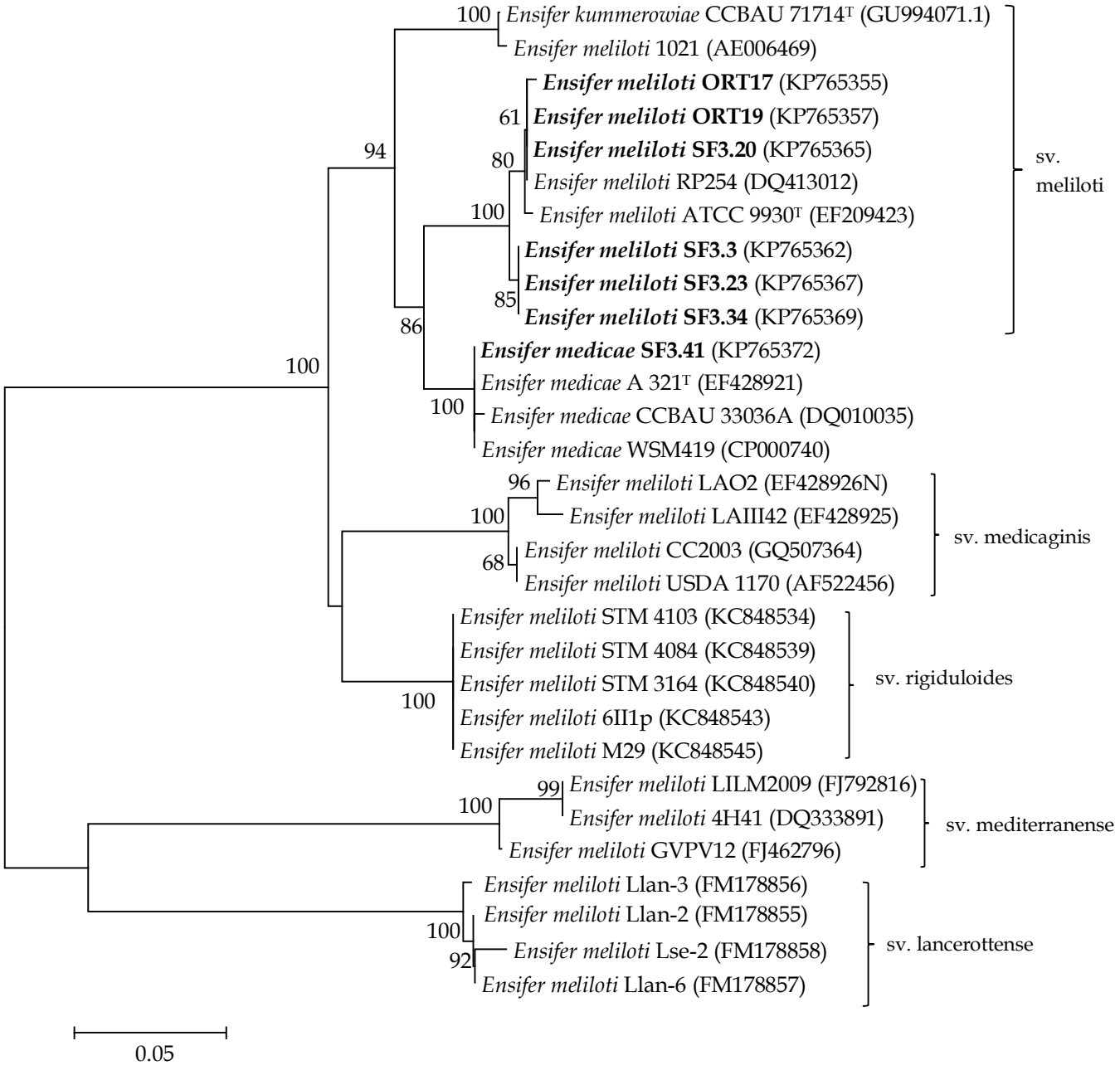


Figura 22. Árbol filogenético donde se aprecia la relación entre las secuencias del gen *nodC* de una serie de aislamientos seleccionados con diferentes cepas de *E. meliloti* pertenecientes a distintas simbiovariedades y *E. medicae*. Se muestran las cepas y los números de acceso de todas las secuencias. Los valores de "bootstrap" representan los porcentajes obtenidos a partir de 1000 réplicas.

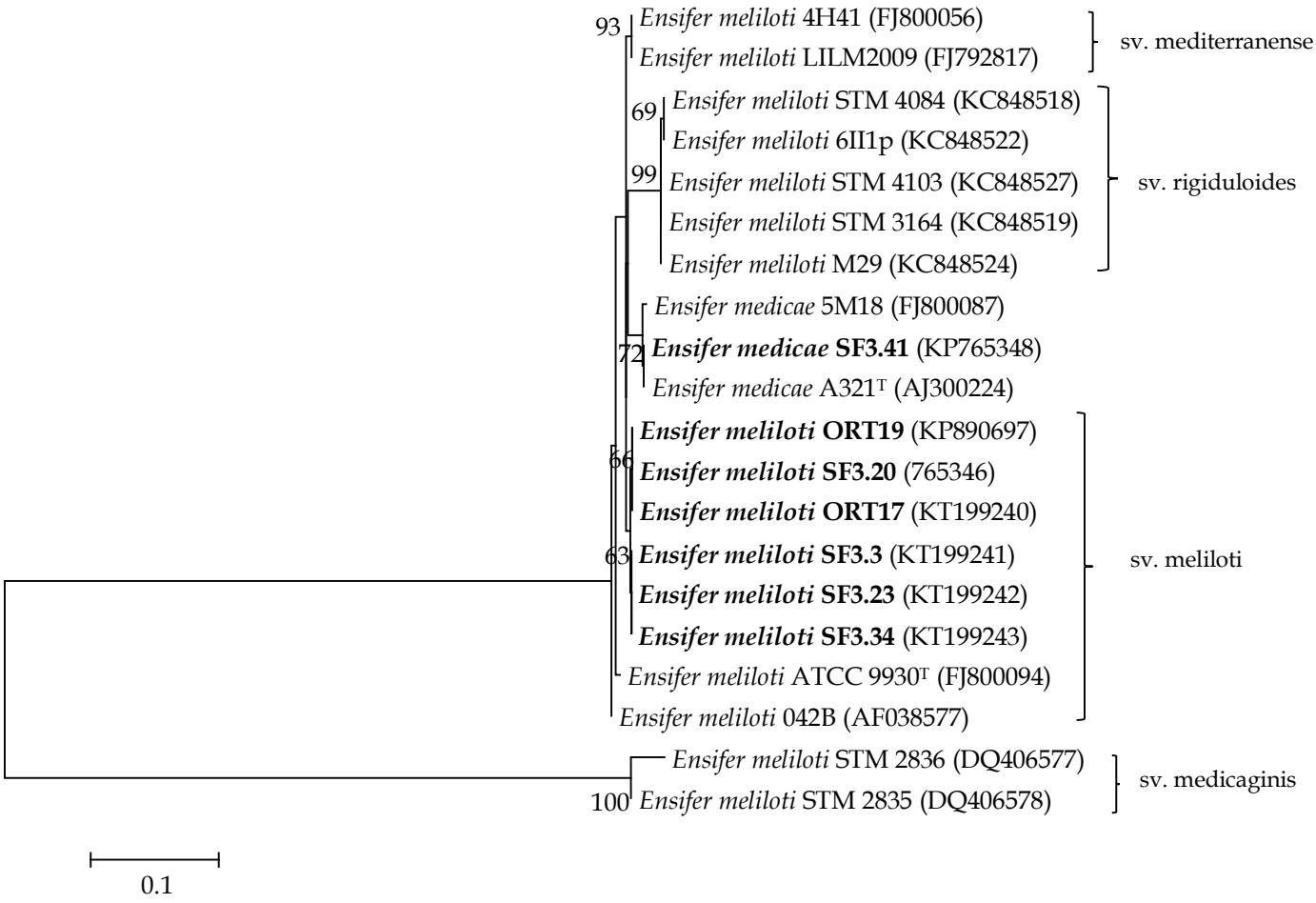


Figura 23. Árbol filogenético donde se aprecia la relación entre las secuencias del gen *nodA* de una serie de aislamientos seleccionados con diferentes cepas de *E. meliloti* pertenecientes a distintas simbiovariedades y *E. medicae*. Se muestran las cepas y los números de acceso de todas las secuencias. Los valores de "bootstrap" representan los porcentajes obtenidos a partir de 1000 réplicas.

Todos estos resultados demuestran que los simbiontes de *M. marina* en las áreas del suroeste de Andalucía pertenecen principalmente a la especie *E. meliloti* sv. meliloti con la excepción de uno de ellos que fue identificado como *E. medicae*. Además, en condiciones de laboratorio esta planta puede ser nodulada por *E. kumerowiae* CCBAU 71714^{T}. Las cepas aisladas fueron tolerantes a diversos factores de estrés abiótico, lo cual indica que el uso de la simbiosis entre *M. marina* y algunos de estos aislamientos pueden ser empleados para la estabilización de los sistemas dunares y enriquecerlos con materia orgánica.

Capítulo 3

Implicación del gen *nolG* en la simbiosis *Ensifer meliloti y E. medicae con Medicago sativa* y en la resistencia a metales pesados.

Los análisis físico-químicos realizados a los suelos de las áreas en las que se ha desarrollado este estudio mostraron que se trataba de zonas contaminadas por metales pesados provenientes de la antigua industria minera y los sedimentos fluviales que allí se depositaron. Estos resultados llevaron al estudio de la resistencia a metales pesados de las bacterias aisladas de estas zonas y de los posibles mecanismos genéticos que originan dicha resistencia.

Tras hacer un rastreo de algunos de los genes que podrían estar implicados en la resistencia a metales pesados en bacterias, se seleccionó el gen *nolG* para hacer un estudio más extenso. Este gen ha sido descrito como uno de los constituyentes del sistema RND (resistencia-nodulación-división celular) probablemente implicado en la expulsión de metales pesados al espacio extracelular como sistema de defensa frente a éstos. Hasta la fecha no se conoce el papel de *nolG* en la simbiosis *Ensifer meliloti y E. medicae con M. sativa*, aunque, como se encuentra en un operón junto con *nodM, nodN y nolF* y bajo un promotor inducible por flavonoides, ha sido denominado como un gen de nodulación más. Por lo tanto, se planteó estudiar su posible implicación no sólo en la tolerancia a metales de estas cepas sino también en la simbiosis con esta planta.

1. Metales pesados presentes en las zonas de estudio

Como se ha visto en los resultados del Capítulo 1 de esta Tesis (Tabla 9), el análisis físico químico de los suelos dio a conocer las grandes concentraciones de algunos metales pesados presentes en las zonas "Recuperada", "No Recuperada" y "Minas de Río Tinto". En la Tabla 21 se ha hecho un resumen de la presencia de metales pesados en cada zona, detallándose sólo los metales que alcanzaron niveles considerados como de contaminación en los parques naturales siguiendo los "Criterios y estándares aplicados en Andalucía y publicados por Galán *et al*. (1999). En ella se puede observar que los suelos del "Arenal seco" y "Arenal inundado" de las Marismas del Odiel se pueden considerar como no contaminados en función a los valores de metales pesados encontrados. Las zonas "No recuperada" y "Recuperada" de las Marismas del Odiel serían consideradas como áreas de tratamiento obligatorio por los niveles detectados de Zn y de Pb, y como áreas de investigación obligatoria en cuanto a sus niveles de Hg, aunque los valores más destacados son los de As y Cu, 3 y 10 veces por encima del valor de intervención en parque naturales respectivamente. El suelo obtenido de las cercanías a las Minas de Río Tinto presentó niveles de Cu que lo calificaron como de tratamiento obligatorio, mientras que en relación a los niveles de Ni, Hg y Cr lo harían de investigación recomendable.

Además de las Marismas del Odiel y Río Tinto, se realizó un estudio físico-químico a los suelos de las dunas de San Fernando, lugar donde se hicieron nuevos aislamientos de *M. marina*. Esta zona, al igual que la zona del "Arenal Seco", donde se aislaron los primeros simbiontes de *M. marina* no presentó valores de concentración de metales pesados considerados como contaminantes, (Tabla 21).

Tabla 21. Nivel de contaminación por metales pesados de los suelos de las zonas de estudio en Marismas del Odiel, Río Tinto y San Fernando.

PARCELA	METALES PESADOS
O2-1 Arenal seco (Marismas del Odiel)	A
O2-3 Arenal inundado (Marismas del Odiel)	A
O3-1 No recuperado (Marismas del Odiel)	Cu (10X) Zn D Pb D As (3X) Hg C
O3-2 Recuperado (Marismas Odiel)	Cu (10X) Zn D Pb D As (3X) Hg C
RT2 Minas de Río Tinto	Cu C Ni B Hg B Cr B
Dunas de San Fernando	A

A: No contaminado, B: Investigación recomendable, C: Investigación obligatoria, D: Tratamiento obligatorio (nivel de intervención), 3X: 3 veces el nivel de intervención en parque naturales, 10X: 10 veces nivel de intervención en parque naturales.

2. Resistencia a metales pesados de los aislamientos de nódulos de leguminosas de las áreas de estudio

Se llevó a cabo un estudio de la tolerancia a metales pesados de las bacterias aisladas de leguminosas procedentes de todas las zonas, tanto de las Marismas del Odiel como de Río Tinto como de las dunas de San Fernando, mediante la inoculación en forma de pequeños parches sobre placas de medio TY con distintas concentraciones de los metales As, Co, Cr, Cs, Cu, Ni, Zn, Cd, Ag y Hg, en las formas de $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$, $CoCl_2$, $K_2Cr_2O_7$, CsCl, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $NiCl_2$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CdCl_2$, $AgNO_3$, $HgCl_2$.

De manera general, los resultados mostraron que las bacterias más tolerantes a estos metales fueron las aisladas de nódulos de plantas de *Medicago* en las zonas del "Arenal seco", concretamente las cepas ORT12 y ORT16 aisladas de *M. marina* y ORT24 y ORT28 de *Medicago* sp.; ORT47 de *M. polymorpha* de la "Ribera del Río Tinto" y SF1.2 de *M. marina* de las "dunas de la playa de San Fernando", también fueron bastante resistentes. En cambio, ORT3, ORT8, ORT9 y ORT10, que se aislaron de la zona "Recuperada", fueron las que presentaron menor tolerancia a metales (datos no

mostrados). Los valores de concentración de metales a los que crecen las bacterias descritos por Nieto *et al*. (1987) además de los referidos por Brim *et al*. (1999) que son considerados como valores de resistencia, son los valores de 10 mM para As, 1 mM para Ag, Cd, Cu, Ni, Pb y Zn; 0,5 para Cr y Co y 0,1 mM para Hg.

Tras un primer y extenso barrido, se seleccionaron una serie de aislamientos bien por ser representativos de una zona en particular por las resistencias mostradas o bien por ser los que mayor número de resistencias presentaba y se compararon con las dos estirpes tipo LMG1 9922^T de *E. mediace* y LMG 6133^T de *E. meliloti*. En concreto, fueron las cepas ORT12, ORT16, SF1.2 y SF3.41 aisladas de *M. marina*; ORT24, ORT28 aisladas de *Medicago* sp.; ORT32, ORT44 y ORT46 de *Trifolium* sp y ORT47, aislada de *M. polymorpha*. Estos aislamientos fueron ensayados nuevamente con distintas concentraciones de los metales As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni y Zn, puesto que no se encontraron valores de tolerancia cercanos a los considerados de resistencia para el Hg, hasta determinar la concentración más alta que les permitió crecer, (Tabla 22). Entre los aislamientos con mayor resistencia se encontraron ORT12, ORT28 y SF1.2; destacando por crecer hasta 1,5 mM de Zn, aunque los demás aislamientos probados presentaron valores de tolerancia, en general, bastante similares. En la Tabla 2 se pueden observar los valores de resistencia en mM de cada aislamiento a los diferentes metales, así como el sumatorio de todas las resistencias en la columna de la derecha como un modo de describir qué cepas son las más tolerantes.

Tabla 22. Niveles máximos de resistencia a metales pesados de una selección de aislamientos de las zonas de las Marismas del Odiel y Río Tinto (ORT), de las dunas de San Fernando (SF) y de las cepas de referencia de *E. meliloti* y *E. medicae*.

PLANTA	CEPA	As (10)	Cd (0,5)	Co (0,5)	Cr (0,5)	Cu (1)	Ni (1)	Zn (1)	Resistencia total (mM)
M. marina	ORT12	15	0,2	1	0,3	2,5	2	1,5	22,5
M. marina	ORT16	15	0,2	1	0,3	2,5	2	1	22
Medicago sp.	ORT24	15	0,2	1	0,3	2,5	2	1	22
Medicago sp.	ORT28	15	0,2	1	0,3	2,5	2	1,5	22,4
Trifolium sp.	ORT32	15	0,25	0,5	0,2	2	2	1	20,95
Trifolium sp.	ORT44	15	0,2	1	0,2	2	2	1	21,4
Trifolium sp.	ORT46	15	0,2	1	0,1	2	2	1	21,3
M. polymorpha	ORT47	15	0,2	0,5	0,3	2	2	1	21

PLANTA	CEPA	As (10)	Cd (0,5)	Co (0,5)	Cr (0,5)	Cu (1)	Ni (1)	Zn (1)	Resistencia total (mM)
M. marina	SF1.2	15	0,25	1	0,5	2	2	1,5	22,25
M.marina	SF3.41	15	0,25	1	0,2	2	2	1	21,45
E. medicae	LMG 19920^T	15	0,2	0,5	0,2	2	2	1	20,9
E. meliloti	LMG 6133^T	15	0,2	1	0,3	2	2	1	21,5

( ): Concentración en mM a partir de la cual una bacteria es considerada resistente (Nieto *et al.*, 1987; Brim *et al.*, 1999).

3. Búsqueda de genes de resistencia a metales pesados

Contando con bacterias resistentes a metales pesados muy diversos, se buscaron genes que podían estar implicados en algunos de los mecanismos de defensa.

3.1 Gen SMc04128 de *E. meliloti* 1021 que codifica una ATPasa de tipo P_{IB} con alta similitud al gen *cadA*

Dado que tanto en *E. meliloti* 1021 como *E. medicae* WSM419 presentaron un gen con una alta similitud al gen *cadA* en sus genomas, se determinó la presencia de este gen en todos los aislamientos pertenecientes a *E. meliloti* de *M. marina*, así como en el único aislamiento de esta planta identificado como *E. medicae* (SF3.41). Tras diseñar los cebadores cadA-2146F, cadA-2146R, cadA-28Emedic-F y cadA-1641Emedic-R, sobre las secuencias del gen *cadA* en *E. meliloti* 1021 (SMc04128) y *E. medicae* WSM419 respectivamente, se comprobó mediante amplificación por PCR la presencia del mismo en todos los aislamientos de *M. marina*. Por este motivo, se llevó a cabo un análisis más detallado de la resistencia a Cd y Zn en todos ellos. Los resultados se muestran en la Tabla 23, donde se puede ver que ninguno de los aislamientos presentaba resistencia a Cd por encima del valor de 0,5 mM. Sin embargo, la resistencia a Zn de todos los aislamientos superó el valor de 1 mM de concentración en el medio de cultivo.

Tabla 23. Resistencia a cadmio y cinc de los aislamientos de *M. marina*

AISLAMIENTO	METAL PESADO (mM)	
	Cd	Zn
ORT11	0,1	1,25
ORT12	0,2	1,5
ORT13	0,1	1,25
ORT16	0,2	1,25
ORT17	0,2	1,25
ORT18	0,2	1,25
ORT19	0,2	1,25
SF1.2	0,25	1,5
SF1.6	0,2	1
SF1.11	0,2	1
SF2.11	0,2	1
SF2.17	0,35	1,25
SF3.1	0,25	1,25
SF3.3	0,25	1,25
SF3.5	0,25	1,25
SF3.9	0,35	1,25
SF3.10	0,35	1,25
SF3.20	0,35	1,25
SF3.21	0,25	1,25
SF3.23	0,25	1,25
SF3.33	0,35	1,25
SF3.34	0,25	1,25
SF3.37	0,35	1,25
SF3.40	0,25	1,25
SF3.41	0,25	1,25
SF3.42	0,25	1,25
SF3.48	0,25	1,25
SF3.49	0,35	1,25
SF3.53	0,35	1,25
SF3.55	0,35	1,25

AISLAMIENTO	METAL PESADO (mM)	
	Cd	Zn
***E. meliloti* LMG 6133^T**	0,25	1
***E. medicae* LMG 19920^T**	0,1	ND

3.2 Gen *nolG*

El gen *nolG* está descrito como uno de los componentes de un sistema RND, cuya función como bomba de exclusión de metales ha sido descrita por Tseng *et al*. (1999), pero del que no se conocen exactamente los sustratos que transporta. Además, como se ha mencionado, este gen se encuentra en tercer lugar en un operón constituido por cuatro genes, dos de ellos, el primero y el ultimo, *nodM* y *nodN,* respectivamente, están descritos como genes de nodulación (Baev *et al*., 1992) y los dos genes centrales *nolF* y *nolG* forman parte de los componentes del sistema RND (Eda *et al*., 2011).

Para abordar el estudio de la implicación de *nolG* en la tolerancia a metales se seleccionaron las estirpes más resistentes a éstos o con alguna otra característica que las hiciera interesantes. Fueron seleccionadas las estirpes *E. meliloti* ORT12 por estar entre las tres más resistentes y la estirpe *E. medicae* SF3.41 porque era bastante resistente y por ser el único aislamiento de *M. marina* perteneciente a la especie *E. medicae*.

En primer lugar, se diseñaron los cebadores nolG-2522-F y nolG-2522-R en base a la secuencia del gen *nolG* de *E. meliloti* 1021, con los que se amplificó un fragmento de aproximadamente 2,5 kb y se comprobó la presencia de este gen en ambos aislamientos, como se muestra en la Figura 24.

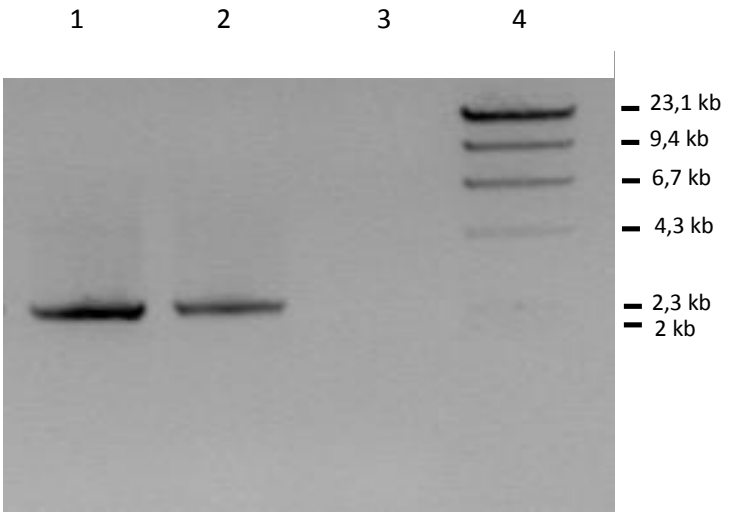


Figura 24. Amplificación por PCR de un fragmento de aproximadamente 2,5 kb correspondiente al gen *nolG*. 1, *E. meliloti* ORT12; 2, *E. medicae* SF3.41; 3, control negativo; 4, marcador de peso molecular λ-*Hind*III.

3.2.1 Secuenciación del gen *nolG* en las estirpes de *E. meliloti* ORT12 y *E. medicae* SF3.41

Se han secuenciado 3105 de las 3198 pb que tiene el gen *nolG* de las estirpes ORT12 y SF3.41. La secuencia de ORT12 mostró 18 diferencias puntuales con la secuencia de *nolG* de *E. meliloti* 1021 (Figura 25). Sin embargo, solamente se ha encontrado una diferencia puntual entre las secuencias del gen *nolG* de SF3.41 con respecto a la de la cepa tipo *E. medicae* WSM419 (Figura 26).

```
ORT12          1 ------------------------------------------------GATGATGGTGATG
Sm1021         1 ATGTTCCTCACACGTATCAGCATCAACCATCCGGTCTTCGCTACCATGATGATGGTGATG
consensus      1 atgttcctcacacgtatcagcatcaaccatccggtcttcgctaccatGATGATGGTGATG

ORT12        134 AGCGAGATCTCACGGCCGATTGAGGCGGCGCTCAACACAATCGGCGGAATCGACACCATC
Sm1021       181 AGCGAGATCTCACGGCCGATTGAGGCGGCGCTCAACACTATCGGCGGAATCGACACCATC
consensus    181 AGCGAGATCTCACGGCCGATTGAGGCGGCGCTCAACAC ATCGGCGGAATCGACACCATC

ORT12        794 GGTTTGCACATCGTTAAGGTCCAAGGCGCCAACACGGTCGAGGTGGCGTCCGCAGTTCGC
Sm1021       841 GGTTTGCACATCGTTAAGGTCCAAGGCGCCAACACGGTCGAGGTTGCGTCCGCAGTTCGC
consensus    841 GGTTTGCACATCGTTAAGGTCCAAGGCGCCAACACGGTCGAGGT GCGTCCGCAGTTCGC

ORT12        974 GGAGGTGTTCTGTCAGTGCTGATCGTGTTCATATTTTTGAACTCCTGGCGATCCACGGTT
Sm1021      1021 GGAGGTGTTCTGTCCGTGCTGATCGTGTTCATATTTTTGAACTCCTGGCGATCCACGGTT
consensus   1021 GGAGGTGTTCTGTC GTGCTGATCGTGTTCATATTTTTGAACTCCTGGCGATCCACGGTT

ORT12       1034 ATCACCGGCCTTACCCTCCCCATTTCAGTTATTGGCACATTCGCGGCAATTTACGCTCTC
Sm1021      1081 ATCACCGGCCTTACTCTCCCCATTTCAGTTATTGGCACATTCGCGGCAATTTACGCTCTC
consensus   1081 ATCACCGGCCTTAC CTCCCCATTTCAGTTATTGGCACATTCGCGGCAATTTACGCTCTC

ORT12       1394 CTTGATCCGATGCTGTCGAGCATTTGGTGCGATCCCCAATCTCAAAAAACTGCCAAGCGA
Sm1021      1441 CTTGATCCGATGCTGTCGAGCTTTTGGTGCGATCCCCAATCTCAAAAAACTGCCAAGCGA
consensus   1441 CTTGATCCGATGCTGTCGAGCaTTTGGTGCGATCCCCAATCTCAAAAAACTGCCAAGCGA

ORT12       1754 ACGTATTCCACTATCAATTCCGGGGAAATGCGTGGCTTCAACAAGGCCCTGGTGGCCGTG
Sm1021      1801 ACGTATTCAACTATCAATTCCGGGGAAATGCGTGGCTTCAACAAGGCCCTGGTGGCCGTG
consensus   1801 ACGTATTC ACTATCAATTCCGGGGAAATGCGTGGCTTCAACAAGGCCCTGGTGGCCGTG
```

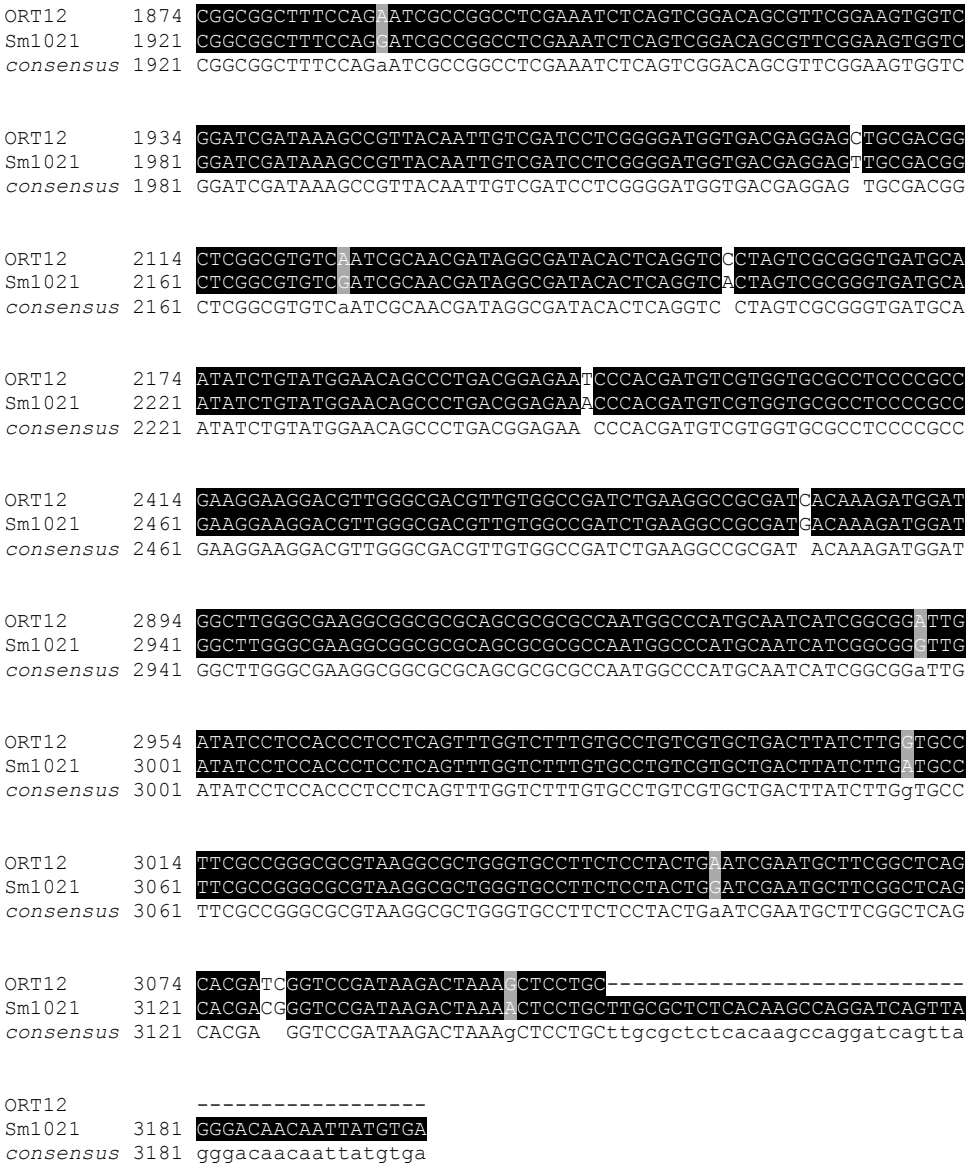


Figura 25. Alineamiento de los fragmentos en los que se han encontrado cambios de la secuencia de nucleótidos del gen *nolG* de *E. meliloti* ORT12 con la correspondiente secuencia homóloga de *E. meliloti* 1021.
En negro se muestran los residuos idénticos entre las distintas secuencias de nucleótidos, en gris los residuos similares y en blanco los diferentes.

```
SF3.41          ------------------
WSM419     3181 GGGACAACAATCATGTGA
consensus  3181 gggacaacaatcatgtga
```

Figura 26. Alineamiento de los fragmentos en los que se han encontrado cambios de la secuencia de nucleótidos del gen *nolG* de *E. medicae* SF3.41 con la correspondiente secuencia homóloga de *E. medicae* WSM419.
En negro se muestran los residuos idénticos entre las distintas secuencias de nucleótidos, en gris los residuos similares y en blanco los diferentes.

Así mismo, se han comparado las secuencias de aminoácidos de las proteínas NolG de ambos aislamientos, ORT12 y SF3.41, con las secuencias de las estirpes *E. meliloti* 1021 y *E. medicae* WSM419, respectivamente, encontrándose 7 aminoácidos diferentes en ORT12 con respecto a *E. meliloti* 1021 (Figura 27), y ninguno en SF3.41 respecto a *E. medicae* WSM419.

```
ORT12         1 ----------------MMVMILVLGLFSYGRLGVDHYPETDLPVVVVATTYTGASPESVE
Sm1021        1 MFLTRISINHPVFATMMMVMILVLGLFSYGRLGVDHYPETDLPVVVVATTYTGASPESVE
consensus     1 mfltrisinhpvfatmMMVMILVLGLFSYGRLGVDHYPETDLPVVVVATTYTGASPESVE

ORT12       465 LDPMLSSIWCDPQSQKTAKRGFFGQLIERFDQWFEGLASRYRSVIYFTFDYRKTTIAIVL
Sm1021      481 LDPMLSSVWCDPQSQKTAKRGFFGQLIERFDQWFEGLASRYRSVIYFTFDYRKTTIAIVL
consensus   481 LDPMLSSiWCDPQSQKTAKRGFFGQLIERFDQWFEGLASRYRSVIYFTFDYRKTTIAIVL

ORT12       705 LGVSIATIGDTLRSLVAGDAISVWNSPDGESHDVVVRLPAAGRENAAQLRNLPIATARMD
Sm1021      721 LGVSIATIGDTLRSLVAGDAISVWNSPDGETHDVVVRLPAAGRENAAQLRNLPIATARMD
consensus   721 LGVSIATIGDTLRSLVAGDAISVWNSPDGEsHDVVVRLPAAGRENAAQLRNLPIATARMD

ORT12       765 DNGKPIMVLLDQVADVVESTAPAQITRKDLSRDIRISSNIEGRTLGDVVADLKAAITKMD
Sm1021      781 DNGKPIMVLLDQVADVVESTAPAQITRKDLSRDIRISSNIEGRTLGDVVADLKAAVTKMD
consensus   781 DNGKPIMVLLDQVADVVESTAPAQITRKDLSRDIRISSNIEGRTLGDVVADLKAAiTKMD

ORT12       945 LRPIVMTTLAMIFGMLPTALGLGEGGAQRAPMAHAIIGGLISSTLLSLVFVPVVLTYLGA
Sm1021      961 LRPIVMTTLAMIFGMLPTALGLGEGGAQRAPMAHAIIGGLISSTLLSLVFVPVVLTYLDA
consensus   961 LRPIVMTTLAMIFGMLPTALGLGEGGAQRAPMAHAIIGGLISSTLLSLVFVPVVLTYL A

ORT12      1005 FAGRVRRWVPSPTESNASAQHDRSDKTKAP---------------
Sm1021     1021 FAGRVRRWVPSPTGSNASAQHDGSDKTKTPACALTSQDQLGTTIM
consensus  1021 FAGRVRRWVPSPT SNASAQHD SDKTK Pacaltsqdqlgttim
```

Figura 27. Alineamiento de los fragmentos en los que se han encontrado cambios de la secuencia de aminoácidos de la proteína NolG de *E. meliloti* ORT12 con la correspondiente proteína homóloga de *E. meliloti* 1021.
En negro se muestran los residuos idénticos entre las distintas secuencias de aminoácidos, en gris los residuos similares y en blanco los diferentes.

4. Construcción de un mutante en el gen *nolG* de *E. meliloti* ORT12 y de *E. medicae* SF3.41

Previamente a la construcción de los mutantes se obtuvieron variantes resistentes espontáneos a rifampicina de las estirpes ORT12 y SF3.41 que recibieron los nombres de SVQ747 y SVQ748, respectivamente, y que son las que se emplearán a partir de este momento en todos los experimentos sucesivos como estirpes parentales.

Los mutantes en el gen *nolG* se construyeron mediante la inserción del casete *lacZ*-Gm. Para ello se construyó previamente el plásmido pMUS1216, que porta un fragmento de 2522 pb de la parte central del gen *nolG* de *E. meliloti* 1021 amplificado por PCR y clonado en el plásmido pGEMT-easy. Este plásmido se digirió con el enzima *Bam*HI cuya única diana se encuentra en el interior de la secuencia del gen *nolG*. El plásmido linealizado de ~5,5 kb se ligó con un fragmento de ~4,4 Kb que contiene el casete *lacZ*-Gm digerido con *Bam*HI y obtenido a partir del plásmido pAB2001. La inserción del casete en el gen *nolG* mediante esta estrategia dio lugar al plásmido pMUS1228 (Figura 28). Finalmente, este plásmido se digirió con la enzima *Not*I para así extraer el fragmento correspondiente al gen *nolG* con la inserción del casete, se convirtieron los extremos cohesivos en romos mediante la enzima Klenow y finalmente se ligó en romo al plásmido pK18*mob*, suicida en rizobios, en el punto *Sma*I del mismo, dando lugar al plásmido pMUS1256. Para finalizar la construcción del mutante en *nolG*, este plásmido se homogenotizó en las estirpes parentales SVQ747 y SVQ748 y de esta forma se obtuvieron los mutantes SVQ749 (= SVQ747 *nolG*::*lacZ*) y SVQ 750 (= SVQ748 *nolG*::*lacZ*).

La homogenotización de la mutación se confirmó mediante hibridación, digiriendo el ADN total de las estirpes parentales SVQ747 y SVQ748 y de los mutantes SVQ749 y SVQ750 con la enzima *Nru*I. Como sonda de hibridación se usó el producto de PCR amplificado con los cebadores nolG_2522F y nolG_2522R, que lleva incorporado nucleótidos marcados con digoxigenina. Mediante el ensayo de hibridación se comprobó que las estirpes mutantes SVQ749 y SVQ750 presentaban una única banda 4,4 kb mayor que la única banda de la estirpe parental, correspondiente a la inserción del casete *lacZ*-Gm en el gen *nolG,* (Figura 29).

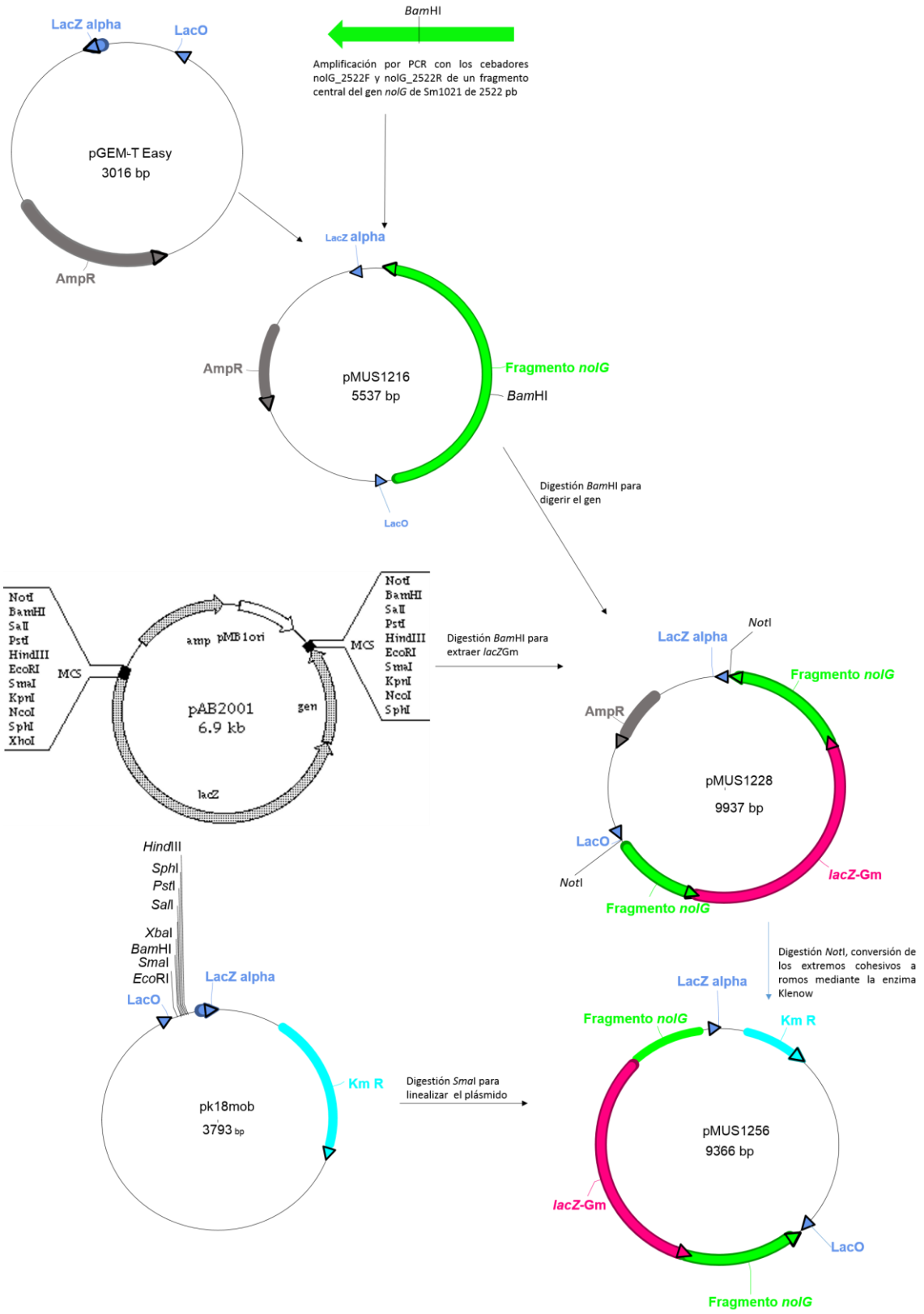


Figura 28. Construcción de los mutantes SVQ749 y SVQ750 por en inserción del casete *lacZ*-Gm en el gen *nolG* de *E. meliloti* SVQ747 y *E. medicae* SVQ748 respectivamente.

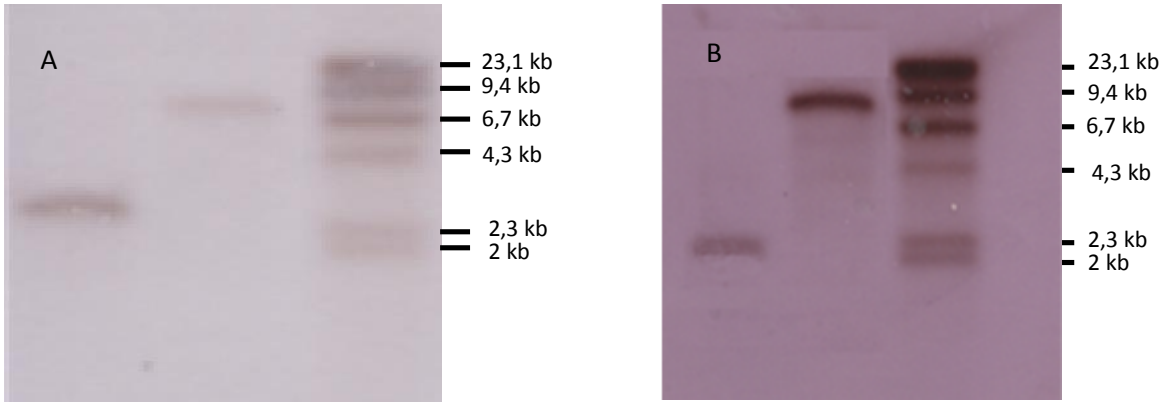


Figura 29. Hibridación en Southern para comprobar los mutantes en el gen *nolG* por inserción del casete *lacZ*-Gm; A, carril 1: SVQ747; carril 2: SVQ749; carril 3: marcador λ *Hind*III. B, carril 1: SVQ748; carril 2: SVQ750; carril 3: marcador λ *Hind*III.

Paralelamente se amplificó mediante PCR una secuencia de 3257 pb a partir del ADN genómico de las estirpes parentales SVQ747 y SVQ748, correspondiente al gen *nolG* completo. Para ello, se utilizaron los cebadores nolG+27F-KpnI y nolG+40R-XbaI, portadores de ambas dianas y los productos de la PCR de ambas estirpes se digirieron con las enzimas *Kpn*I y *Xba*I y se clonaron en el vector pBBR1MCS-2, previamente digerido con las mismas enzimas, generando así los plásmidos pMUS1306 y pMUS1313, respectivamente, (Figuras 30 y Figura 31) que llevan el gen *nolG* sin su promotor, bajo la expresión del promotor T7 del plásmido pBBR1MCS-2. Estos plásmidos se conjugaron con los mutantes respectivos, SVQ749 y SVQ750, obteniéndose las estirpes SVQ749 pMUS1306 y SVQ750 pMUS1313.

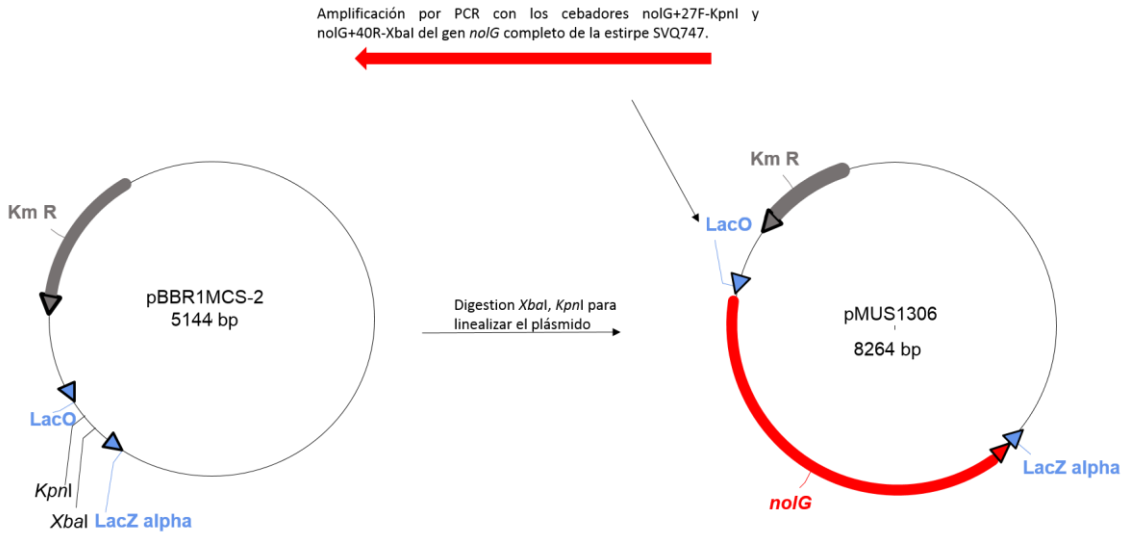


Figura 30. Construcción del plásmido pMUS1306 por clonación de un fragmento de 3257 pb correspondientes al gen *nolG* completo de *E. meliloti* SVQ747, en el plásmido pBBR1MCS-2.

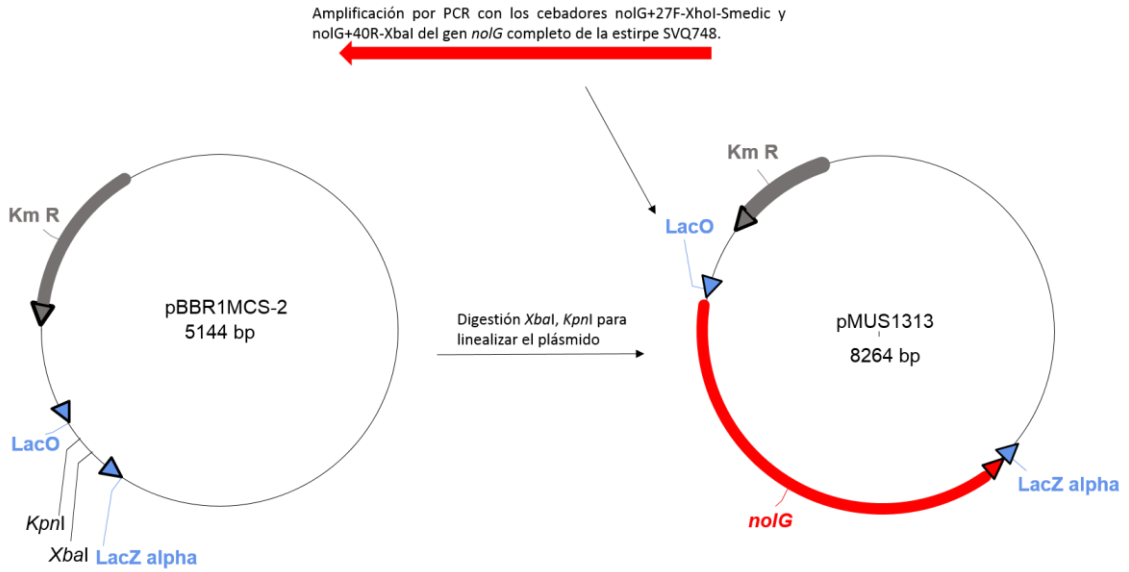


Figura 31. Construcción del plásmido pMUS1313 por clonación de un fragmento de 3257 pb correspondientes al gen *nolG* completo de *E. medicae* SVQ748, en el plásmido pBBR1MCS-2.

5. Caracterización de los mutantes en el gen *nolG* de *E. meliloti* SVQ747 y *E. medicae* SVQ748 por la inserción del casete *lacZ*-Gm

5.1Respuesta a metales pesados

Una vez construidos los mutantes por inserción del casete *lacZ*-Gm en el gen *nolG* y con el objetivo de comprobar la implicación de este sistema de transporte en la exclusión de metales pesados, se hicieron estudios de tolerancia a metales pesados y curvas de crecimiento en presencia de éstos.

5.1.1 Tolerancia a los metales pesados

Las estirpes parentales, SVQ747 y SVQ748 y sus correspondientes mutantes por inserción en el gen *nolG*, SVQ749 y SVQ750, fueron estudiados para su capacidad de tolerancia a los metales Cd, en forma de $CdCl_2$ 50mM; Zn, en forma de $ZnSO_4$ 500 mM; Cu, en forma de $CuSO_4$ 500 mM; Co, como $CoCl_2$ 100 mM y Ni, como Cl_2Ni 200 mM, mediante el método de difusión en disco.

Los resultados mostraron que SVQ747 y SVQ749 presentaron un rango de tolerancia a metales pesados bastante similar, ya que no se apreció una disminución de los halos de inhibición con los metales ensayados del mutante frente al parental. En el caso de la comparación entre la estirpe parental *E. medicae* SVQ748 y el mutante SVQ750 (Figura 32) se apreciaron leves diferencias en la tolerancia a Cd y a Zn, que no fueron

estadísticamente significativas. Los resultados medidos en milímetros del halo de inhibición formado en las placas, se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24. Medida en milímetros del diámetro del halo de inhibición formado por diferentes concentraciones en metales pesados en las estirpes de *E.meliloti* SVQ747 y *E. medicae* SVQ748 y sus correspondientes mutantes por inserción del casete *lacZ*-Gm, SVQ749 y SVQ750

Estirpe	Cu ($CuSO_4$) 500 mM (mm)	Zn ($ZnSO_4$) 500 mM (mm)	Cd ($CdCl_2$) 50 mM (mm)	Co ($CoCl_2$) 100 mM (mm)	Ni ($NiCl_2$) 200 mM (mm)
SVQ747	12,6 ± 2,9 A	22,2 ± 4,1 A	13 ± 1,7 A	13 ± 2,1 A	14,4 ± 2,9 A
SVQ749	12,4 ± 3,8 A	21,4 ± 4,1 A	12,4 ± 1,7 A	12,4 ± 1,3 A	13,2 ± 2,5 A
SVQ748	19 ± 1,7A	19,3 ± 4,9 A	13,7 ± 3,2 A	14 ± 2,6 A	13,3 ± 2,1 A
SVQ750	20,6 ± 3,8 A	23 ± 5,6 A	16 ± 1,7 A	15,3 ± 3,5 A	12,3 ± 2,1 A

Las cifras seguidas de una misma letra, dentro de cada columna, no difieren significativamente al nivel del 5%.

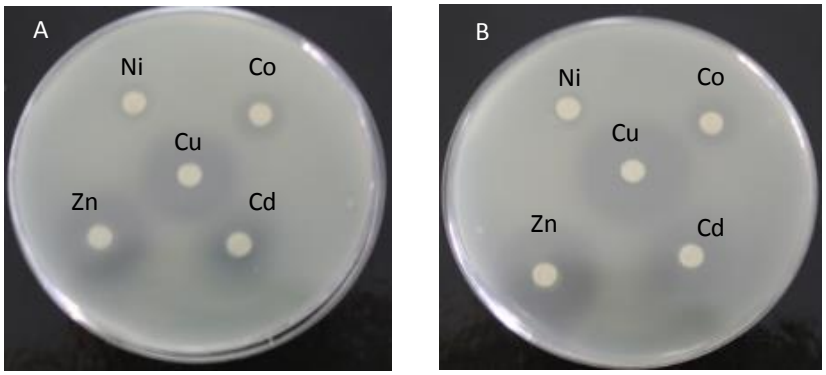


Figura 32. Halos de inhibición del crecimiento formados por metales pesados en la estirpe A, SVQ748; B, SVQ750.

5.1.2 Curva de crecimiento en presencia de metales pesados

Se realizaron curvas de crecimiento en medio TY líquido con dos metales pesados, cinc y cadmio en las que además de ensayar SVQ747 y SVQ748 y sus respectivos mutantes, SVQ749 y SVQ750, se incluyeron a los mutantes a los que se les había introducido por conjugación los plásmidos pMUS1306 y pMUS1313 que portan una copia silvestre del gen *nolG* de SVQ747 y de SVQ748, respectivamente. El $ZnSO_4$ se utilizó a concentraciones de 0,56 mM y 0,27 mM para *E. meliloti* y *E. medicae,* respectivamente, mientras que el $CdCl_2$ se usó a una concentración de 0,2 mM para las

estirpes de *E. meliloti* y a 0,075 mM para las cepas de *E. medicae*. Todas las concentraciones se tomaron por ser las equivalentes a la mitad de la concentración mínima inhibitoria. Se realizaron medidas de D.O. a 600 nm hasta las 140 horas después de la inoculación, no encontrándose diferencias sustanciales entre las estirpes parentales y sus mutantes en *nolG* en ninguna de las dos especies bacterianas tal y como se observa en las Figuras 33, 34, 35 y 36.

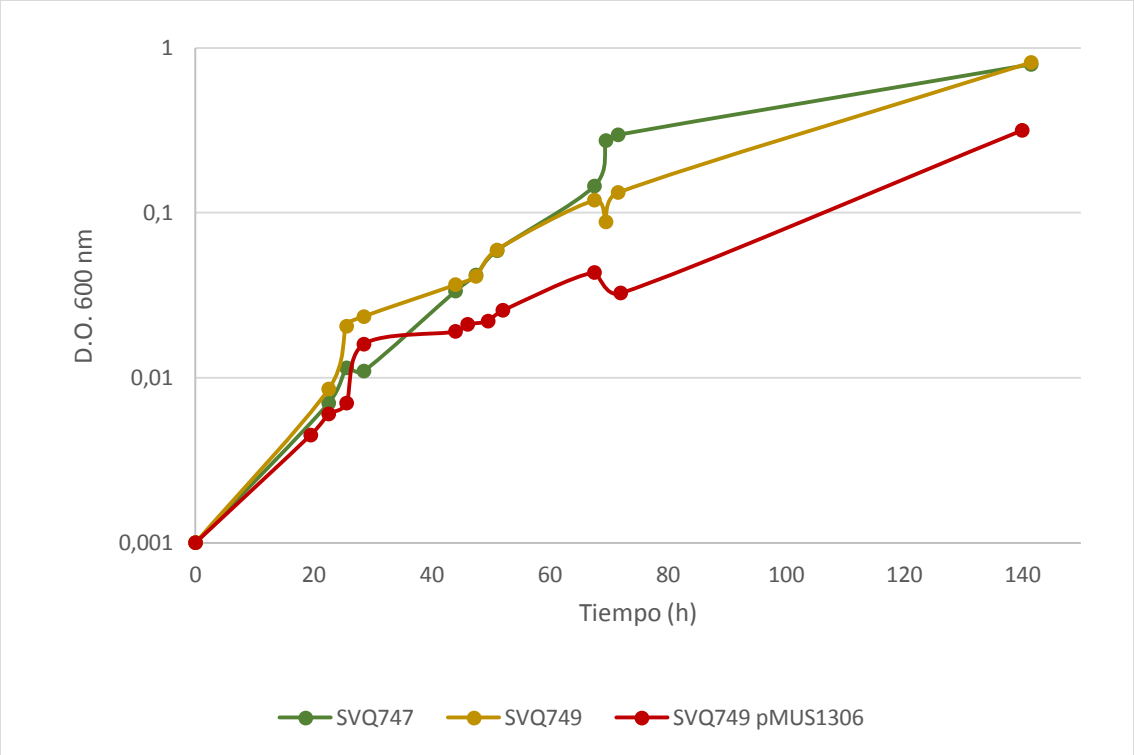


Figura 33. Curva de crecimiento de las estirpes SVQ747, SVQ749 y SVQ749 pMUS1306 de *E. meliloti*, en medio TY suplementado con $CdCl_2$ a una concentración de 0,2 mM.

Figura 34. Curva de crecimiento de las estirpes SVQ747, SVQ749 y SVQ749 pMUS1306 de *E. meliloti*, en medio TY suplementado con $ZnSO_4$ a una concentración de 0,56 mM.

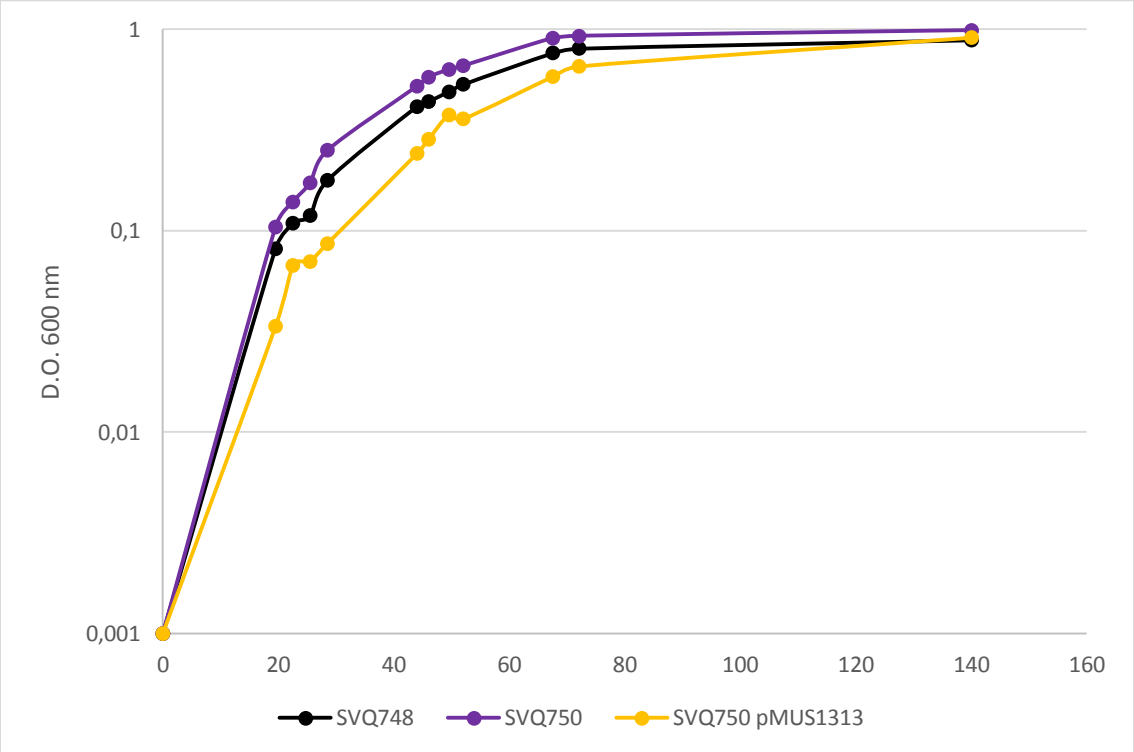


Figura 35. Curva de crecimiento de las cepas SVQ748, SVQ750 y SVQ750 pMUS1313 de *E. medicae*, en medio TY suplementado con $CdCl_2$ a una concentración de 0,075 mM.

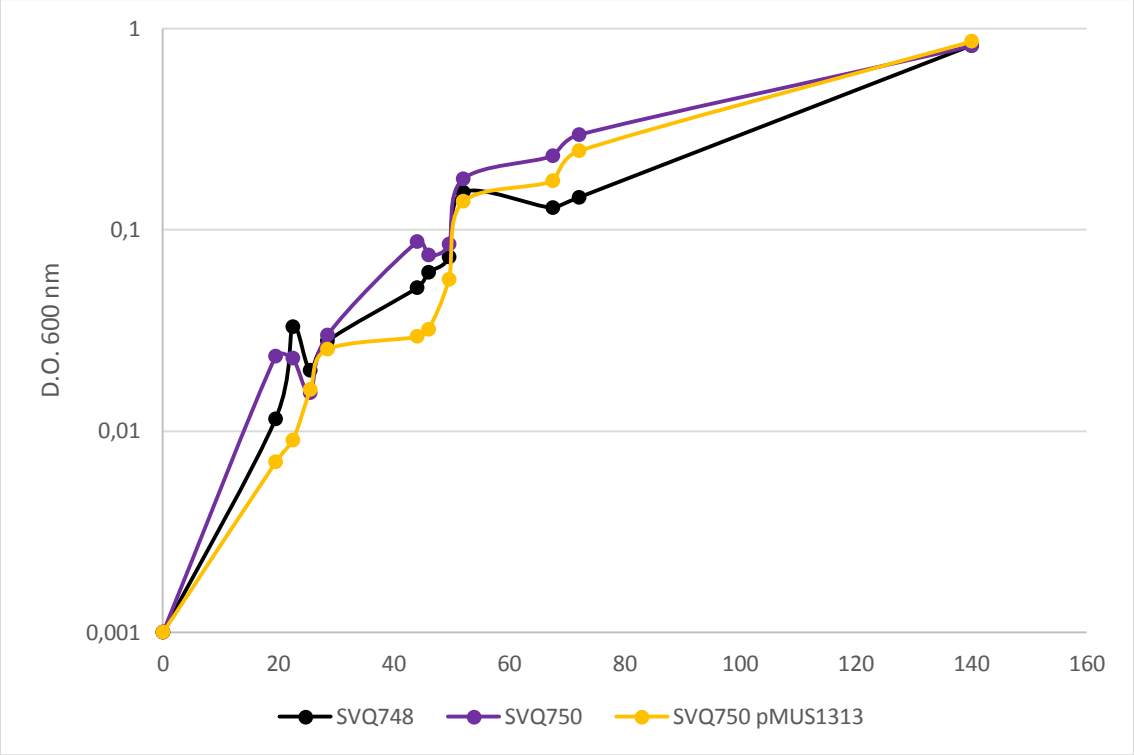


Figura 36. Curva de crecimiento de las cepas SVQ748, SVQ750 y SVQ750 pMUS1313 de *E. medicae*, en medio TY suplementado con $ZnSO_4$ a una concentración de 0,27 mM.

5.2 Movilidad tipo *swimming*

Dado que los sistemas RND son componentes de membrana, se consideró de interés estudiar en los mutantes *nolG* la movilidad tipo *swimming* para averiguar si existían algunas diferencias con las estirpes parentales. Los ensayos se realizaron en medio Bromfield (0,3 % de agar, suplementados con kanamicina en caso de que la cepa portase algún plásmido derivado de pBBR1MCS-2),

Antes de realizar los experimentos de movilidad se hicieron curvas de crecimiento en medio Bromfield para determinar si las bacterias presentaban diferencias de crecimiento en este medio (Figura 37). Los resultados obtenidos indicaron que no existían diferencias significativas en el crecimiento en este medio entre las cepas silvestres y sus respectivas estirpes mutantes.

Los resultados movilidad tipo *swimming* mostraron leves diferencias de movilidad entre las estirpes parentales y mutantes, observándose un ligero aumento de la movilidad *swimming* en el caso del mutante de *E. meliloti* SVQ749 respecto al parental SVQ747, (Figura 38) y, justo al contrario, una leve disminución en el caso del mutante de *E. medicae* SVQ750 respecto de la cepa parental SVQ748, que en ninguno de los casos

fueron estadísticamente significativas (Figura 41). Este cambio de movilidad revirtió cuando se introdujo el plásmido pMUS1306 en la estirpe SVQ749 ya que al comparar con la estirpe SVQ749 pBBR1MCS-2 se vio una disminución de la movilidad estadísticamente significativa de la primera cepa respecto a la segunda, (Figura 39). Un caso similar se observó en *E. medicae*, donde hubo un ligero aumento de la movilidad considerado estadísticamente significativo en la estirpe SVQ750 pMUS1313 en comparación con la estirpe SVQ750 pBBR1MCS-2, (Figura 42).

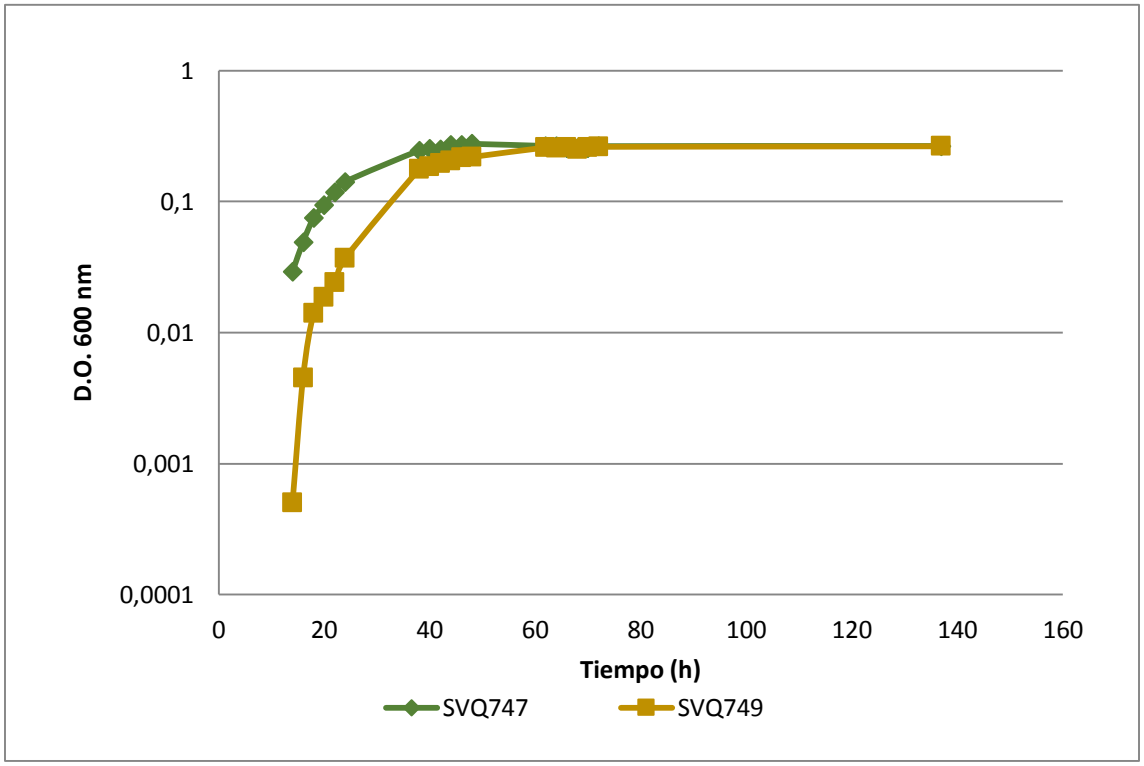


Figura 37. Curva de crecimiento en medio Bromfield de la estirpe parental *E. meliloti* SVQ747 y la cepa mutante SVQ749.

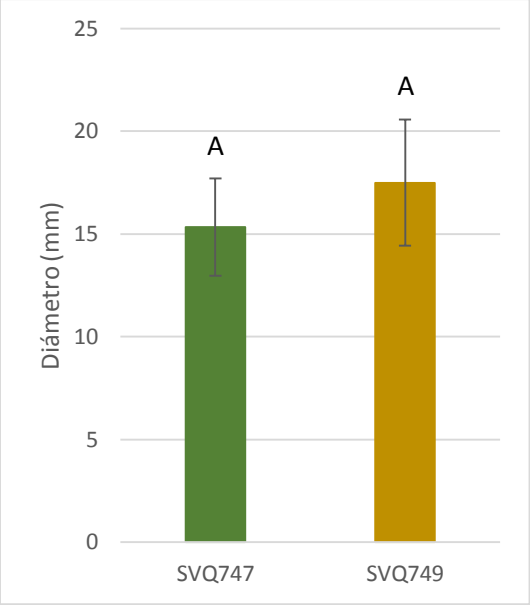


Figura 38. Movilidad tipo *swimming* en medio Bromfield 0,3% de agar, medida según el diámetro en mm del halo de movilidad del parental *E. meliloti* SVQ747 y su derivado mutante en el gen *nolG*, SVQ749. Las columnas con una misma letra no difieren significativamente al nivel del 5%.

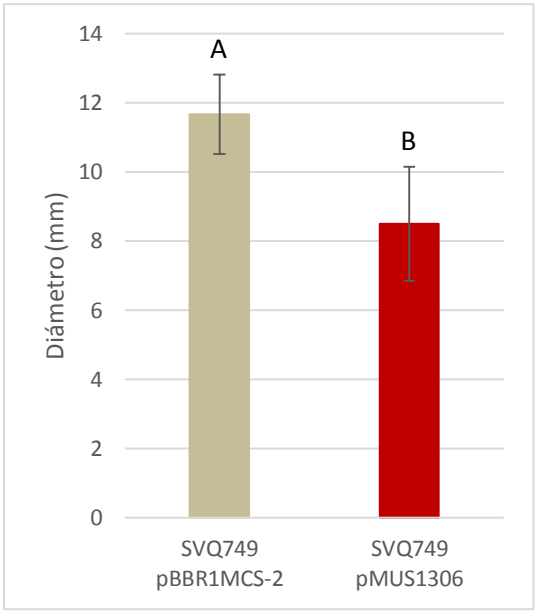


Figura 39. Movilidad tipo *swimming* en medio Bromfield 0,3% de agar y kanamicina 60 µg ml^{-1}, medida según el diámetro en mm del halo de movilidad de las estirpes *E. meliloti* SVQ749 pBBR1MCS-2 y SVQ749 pMUS1306. Las columnas con una misma letra no difieren significativamente al nivel del 5%.

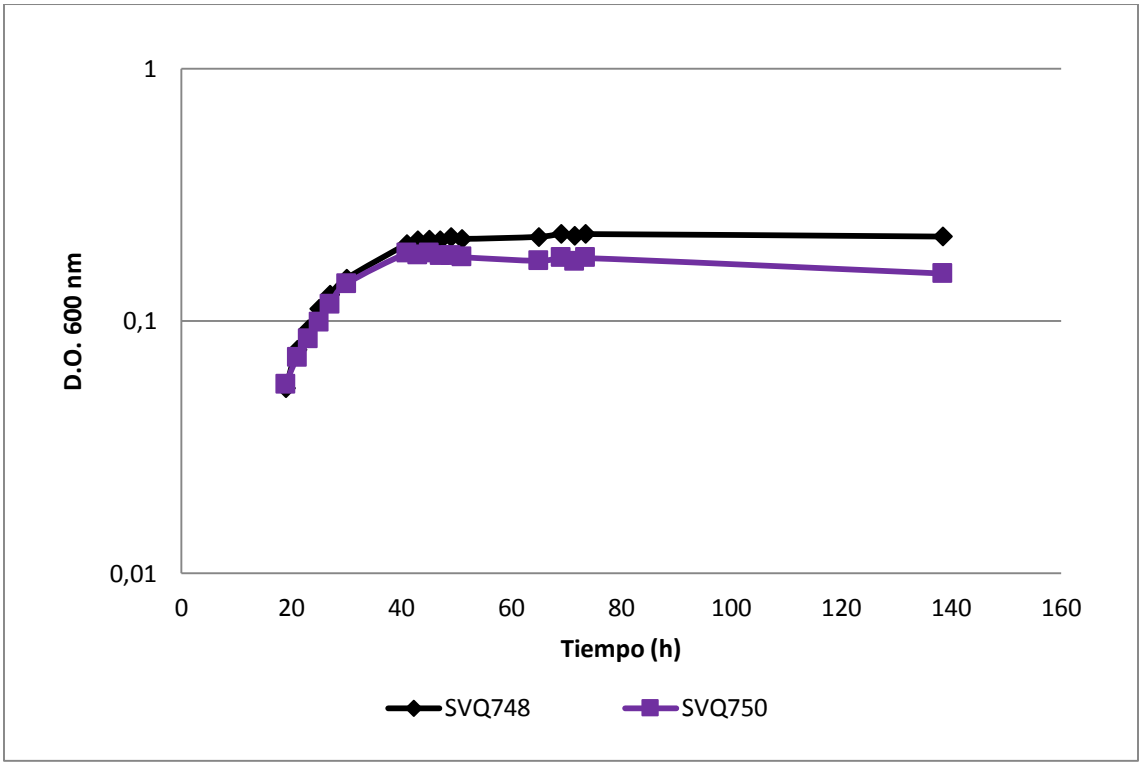


Figura 40. Curva de crecimiento en medio Bromfield de la estirpe parental *E. medicae* SVQ748 y la cepa mutante SVQ750.

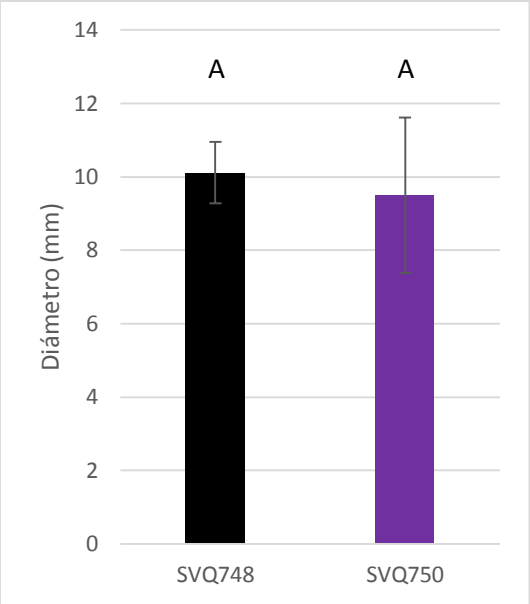


Figura 41. Movilidad tipo *swimming* en medio Bromfield 0,3% de agar, medida según el diámetro en mm del halo de movilidad del parental *E. medicae* SVQ748 y su derivado mutante en el gen *nolG*, SVQ750. Las columnas con una misma letra no difieren significativamente al nivel del 5%.

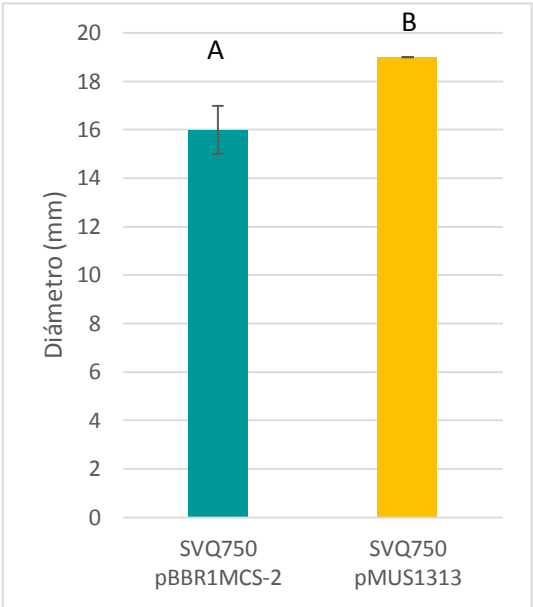


Figura 42. Movilidad tipo *swimming* en medio Bromfield 0,3% de agar y kanamicina 30 µg ml^{-1}, medida según el diámetro en mm del halo de movilidad de las estirpes *E. medicae* SVQ750 pBBR1MCS-2 y SVQ750 pMUS1313. Las columnas con una misma letra no difieren significativamente al nivel del 5%.

5.3 Fenotipo en respuesta a flavonoides

5.3.1 Estudio de la capacidad de inducción por flavonoides de los genes de nodulación mediante la actividad β-galactosidasa

Dado que los datos bibliográficos describen que el operón *nodMnolFGnodN* se encuentra bajo la influencia de un promotor *nod* inducible por luteolina, se investigó la capacidad de inducción de diferentes flavonoides sobre los genes de nodulación de *E. meliloti* SVQ747 y de *E. medicae* SVQ748. Para ello se realizaron experimentos de actividad β-galactosidasa de estas estirpes tras transferirles por conjugación el plásmido pMP240, que porta el promotor del gen *nodA* de *R. leguminosarum* bv viciae fusionado al gen *lacZ* sin promotor, tras la inducción con una serie de 20 flavonoides distintos. Los resultados mostraron que ninguno de los flavonoides daba lugar a valores de inducción como los que cabría esperar para los genes de nodulación en ninguna de las dos cepas de ambas especies, aunque tres de ellos provocaron valores de inducción ligeramente

más altos en *E. meliloti* SVQ747, sobresaliendo entre ellos la isoliriquitigenina con un valor de 3,08 veces de inducción frente al control sin inducir.

Estos flavonoides, isoliriquitigenina, luteolina y 4-7 dihidroxiflavona, fueron seleccionados como inductores para ver si se observaban diferencias entre los valores de inducción de pMP240 en las cepas parentales, frente a los de las fusiones *lacZ*-Gm en los genes *nolG* presentes en las cepas mutantes. Los resultados mostraron valores de inducción aún menores en el caso de SVQ749 frente a SVQ747 pMP240 con los tres flavonoides, pero iguales (caso de la isoliriquitigenina) o un poco superiores (caso de la 4-7 dihidroxiflavona) en la estirpe *E. medicae* SVQ750 frente a SVQ748 pMP240. Los resultados de actividad mostrada por las cepas de estudio inducidas con flavonoides frente a la actividad basal sin inducir, se muestran en las Tablas 25 y 26.

Tabla 25. Actividad β-galactosidasa, Unidades Miller de inducción del promotor del gen *nodA* en la estirpe SVQ747 con diferentes flavonoides y número de veces de inducción respecto del control sin flavonoides.

	***E. meliloti* SVQ747 pMP240**		***E. medicae* SVQ748 pMP240**	
	Actividad β-galactosidasa (Unidades Miller)	**Nº de veces de inducción**	**Actividad β-galactosidasa (Unidades Miller)**	**Nº de veces de inducción**
YM (control)	141,98 ± 8,73 CD	1,00	205,88 ± 69,32 A	1,00
Kaempferol	166,67 ± 43,65 BD	1,17	125,00 ± 58,93 A	0,61
Morina	160,92 ± 16,26 BD	1,13	157,41 ± 13,09 A	0,76
Daidzeína	138,89 ± 19,64 CD	0,98	208,33 ± 88,39 A	1,01
Genisteína	135,80 ± 0 CD	0,96	133,33 ± 23,57 A	0,65
Apigenina	192,31 ± 0 BD	1,35	212,96 ± 39,28 A	1,03
4-7 Dihidroxiflavona	231,18 ± 7,6 BC	1,63	192,98 ± 24,81 A	0,94
Hesperitina	145,16 ± 7,6 CD	1,02	345,24 ± 84,18 A	1,68
Naringenina	133,33 ± 15,71 CD	0,94	239,58 ± 73,66 A	1,16
Luteolina	269,23 ± 18,13 B	1,90	243,59 ± 18,13 A	1,18

	E. meliloti SVQ747 pMP240		*E. medicae* SVQ748 pMP240	
	Actividad β-galactosidasa (Unidades Miller)	**Nº de veces de inducción**	**Actividad β-galactosidasa (Unidades Miller)**	**Nº de veces de inducción**
Crisina	196,43 ± 8,42 BD	1,38	180,56 ± 58,93 A	0,88
Isoliriquitigenina	436,78 ± 65,02 A	3,08	254,39 ± 12,41 A	1,24
Fisetina	146,67 ± 18,86 CD	1,03	176,47 ± 0 A	0,86
5 Hidroxiflavona	142,86 ± 16,84 CD	1,01	155,56 ± 0 A	0,76
6 Hidroxiflavona	154,32 ± 8,73 BD	1,09	239,58 ± 103,12 A	1,16
Flavona	179,01 ± 8,73 BD	1,26	157,41 ± 13,09 A	0,76
Flavonona	105,56 ± 23,57 D	0,74	206,35 ± 22,45 A	1,00
7 Hidroxiflavona	166,67 ± 19,64 BD	1,17	187,50 ± 58,93 A	0,91
Coumestrol	192,31 ± 54,39 BD	1,35	177,78 ± 62,85 A	0,86
Quercetina	89,29 ± 58,93 D	0,63	202,38 ± 16,84 A	0,98
Umbeliferona	130,95 ± 33,67 CD	0,92	133,33 ± 0 A	0,65

Las cifras seguidas de una misma letra, dentro de cada columna, no difieren significativamente al nivel del 5%.

Tabla 26. Actividad β-galactosidasa, Unidades Miller de inducción del promotor del gen *nodA* en las estirpes parentales SVQ747 y SVQ 748 en comparación con la inducción del gen *lacZ* insertado en el gen *nolG* en las estirpes mutantes SVQ749 y SVQ750.

	E. meliloti SVQ747		*E. meliloti* SVQ749	
	Actividad β-galactosidasa (Unidades Miller)	**Nº veces inducción**	**Actividad β-galactosidasa (Unidades Miller)**	**Nº veces inducción**
YM (control)	141,98 ± 8,73 A	1,00	78,70 ± 21,22 A	1,00
Isoliriquitigenina	436,78 ± 65,02 B	3,08	111,11 ± 42,00 A	1,41
Luteolina	269,23 ± 18,13 B	1,90	71,68 ± 6,21 A	0,65

	E. meliloti SVQ747		*E. meliloti* SVQ749	
	Actividad β-galactosidasa (Unidades Miller)	**Nº veces inducción**	**Actividad β-galactosidasa (Unidades Miller)**	**Nº veces inducción**
4-7 Dihidroxiflavona	231,18 ± 7,6 B	1,63	63,49 ± 15,87 A	0,89
	***E. medicae* SVQ748**		***E. medicae* SVQ750**	
	Actividad β-galactosidasa (Unidades Miller)	**Nº veces inducción**	**Actividad β-galactosidasa (Unidades Miller)**	**Nº veces inducción**
YM (control)	205,88 ± 69,32 A	1,00	55,56 ± 6,01 A	1,00
Isoliriquitigenina	254,39 ± 12,41 A	1,24	68,97 ± 11,49 A	1,24
Luteolina	243,59 ± 18,13 A	1,18	55,56 ± 0 A	0,81
4-7 Dihidroxiflavona	192,98 ± 24,81 A	0,94	71,98 ± 14,98 A	1,29

Las cifras seguidas de una misma letra, dentro de cada columna, no difieren significativamente al nivel del 5%.

5.3.2 Curvas de crecimiento en presencia de luteolina

Se eligió la luteolina como flavonoide inductor, ya que está descrito como uno de los principales flavonoides de los genes *nod* de *E. meliloti*, a pesar de que no es el que mayor inducción produjo en SVQ747, SVQ748 y sus derivados. De este modo se hicieron curvas de crecimiento en presencia de luteolina (1 μg ml^{-1}) para estudiar la influencia que pudiera tener este flavonoide en el crecimiento de las cepas parentales en comparación con las estirpes mutantes en el gen *nolG* y las cepas que portan una copia silvestre del gen *nolG* en el plásmido pMUS1306. No se observaron diferencias en el crecimiento entre las tres estirpes de *E. meliloti*, SVQ747, SVQ749 y SVQ749 pMUS1306, ni en ausencia ni en presencia del flavonoide luteolina (Figuras 43 y 44). Así como tampoco se apreciaron diferencias en el caso de la estirpe parental *E. medicae* SVQ748 y su mutante SVQ750, pero sí se notó un ligero retraso en el tiempo de generación de la cepa SVQ750 pMUS1313, (Figuras 45 y 46).

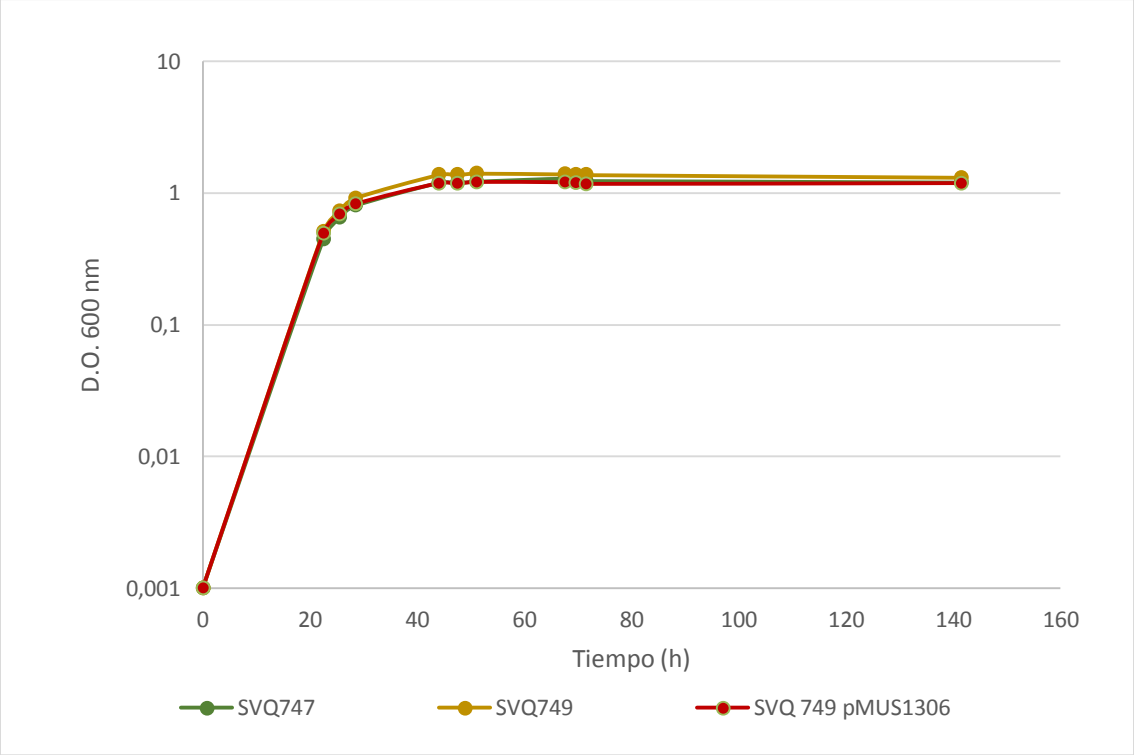


Figura 43. Curva de crecimiento en medio TY de *E. meliloti* SVQ747 y sus derivados SVQ749 y SVQ749 pMUS1306.

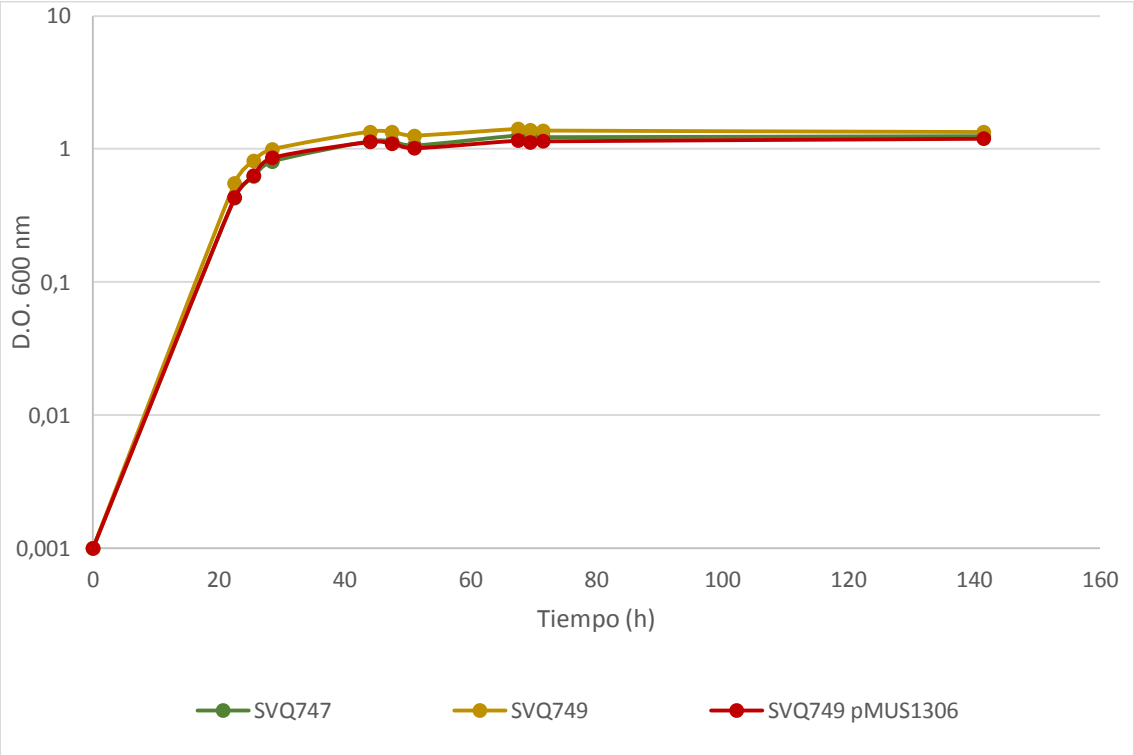


Figura 44. Curva de crecimiento en medio TY suplementado con luteolina (1 µg ml^{-1}) de *E. meliloti* SVQ747 y sus derivados SVQ749 y SVQ749 pMUS1306.

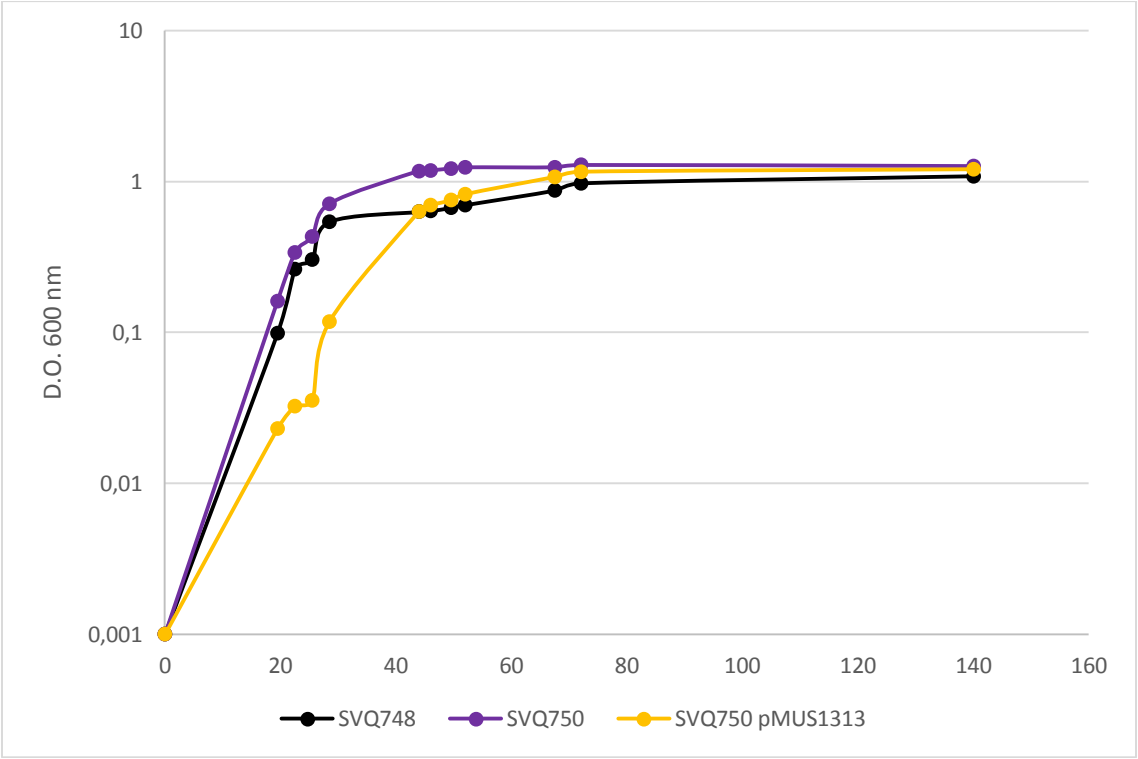


Figura 45. Curva de crecimiento en medio TY de *E. medicae* SVQ748 y sus derivados SVQ750 y SVQ750 pMUS1313.

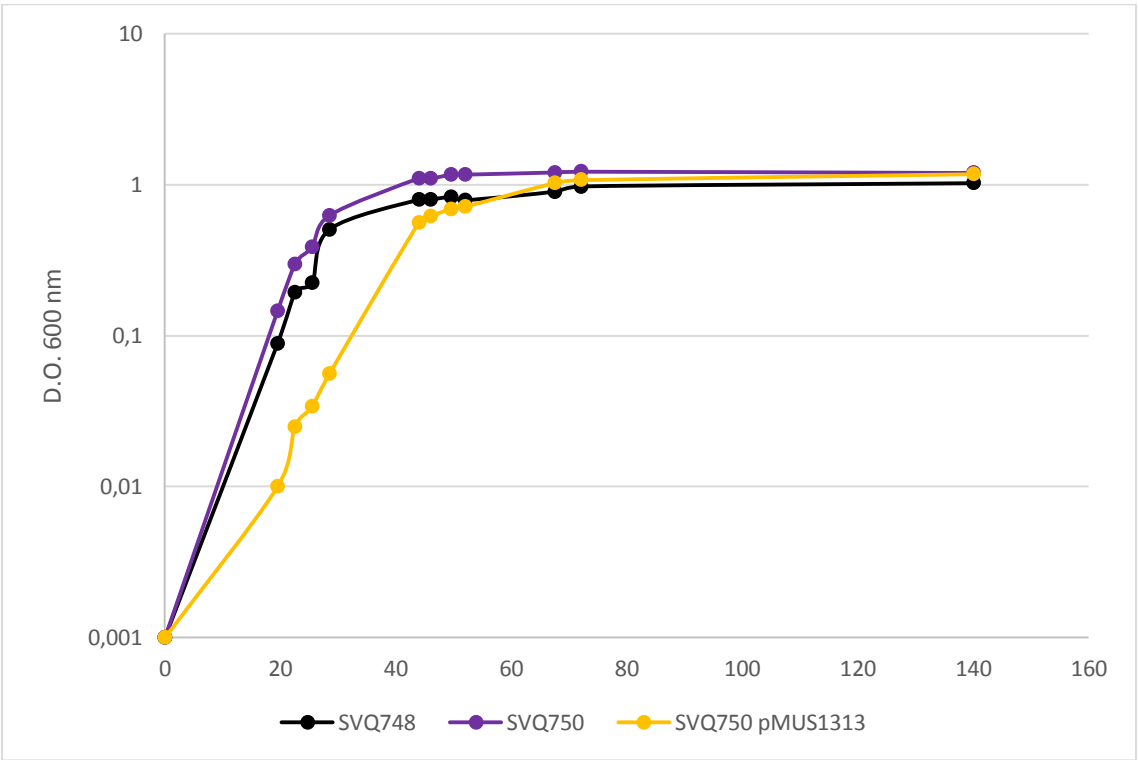


Figura 46. Curva de crecimiento en medio TY suplementado con luteolina (1 µg ml^{-1}) de *E. medicae* SVQ748 y sus derivados SVQ750 y SVQ750 pMUS1313.

5.3.3 Movilidad de tipo *swimming* en presencia de luteolina

Tras no detectarse diferencias en las curvas de crecimiento en presencia de luteolina entre parentales y mutantes, se realizaron experimentos de movilidad de tipo *swimming* con luteolina (1 µg ml^{-1}), usando metanol (1 µl ml^{-1}) (disolvente del flavonoide) como control. Los resultados mostraron que la luteolina provocó una disminución de la movilidad estadísticamente significativa tanto en SVQ747 como en su derivado mutante por inserción en el gen *nolG*, SVQ749. Además, se observó un aumento de la movilidad por efecto del metanol que en ambos casos se considera estadísticamente significativa.
De nuevo se observó que el mutante SVQ749 es más móvil que su parental, SVQ747, tanto en ausencia como en presencia de luteolina, (Figura 47).
A diferencia de lo ocurrido en *E. meliloti*, en el caso de *E. medicae* SVQ748 hubo una ligera disminución en la movilidad debida a la presencia del luteolina, que no fue estadísticamente significativa, y no se apreció un aumento en la misma por efecto del metanol. La luteolina y el metanol provocaron los mismos efectos en ambas estirpes de *E. medicae*, pero con una disminución significativa del mutante SVQ750 frente al parental SVQ748 en todas ellas (Figura 48).

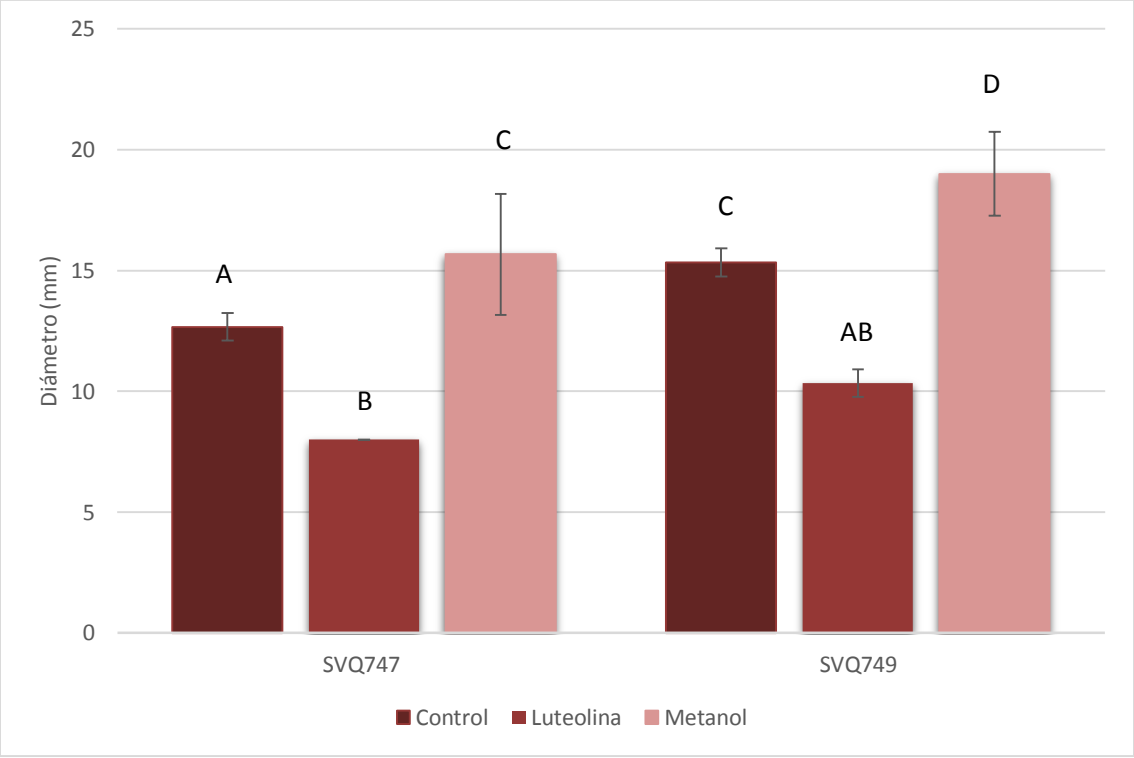


Figura 47. Movilidad tipo *swimming* en presencia de luteolina (1 µg ml^{-1}), medida según el diámetro en mm del halo de movilidad de la estirpe *E. meliloti* SVQ747 y su mutante SVQ749. Las columnas con una misma letra no difieren significativamente al nivel del 5%.

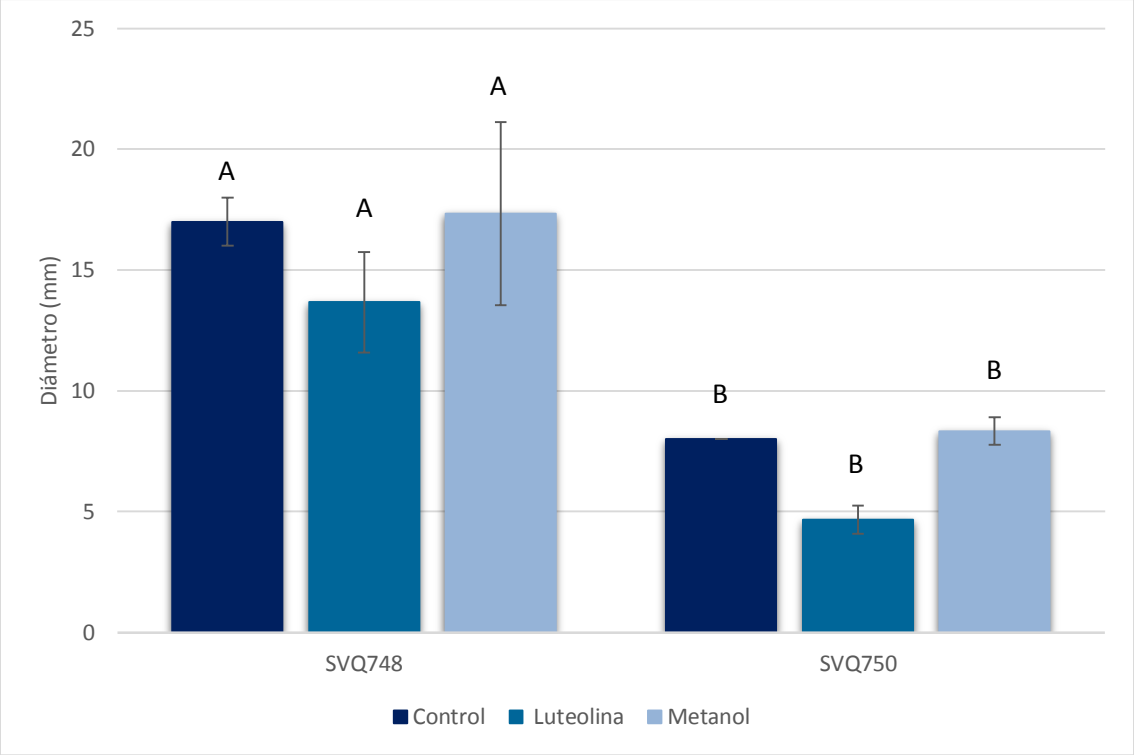


Figura 48. Movilidad *swimming* en presencia de luteolina (1 µg ml^{-1}), medida según el diámetro en mm del halo de movilidad de la estirpe *E. medicae* SVQ748 y su derivado mutante *nolG*, SVQ750. Las columnas con una misma letra no difieren significativamente al nivel del 5%.

5.4 Fenotipo simbiótico

Gran parte del interés por el operón *nodMnolFGnodN* fue la presencia en él de genes de nodulación, por lo que se hicieron experimentos competitividad, eficiencia y cinética de la nodulación en plantas de *M. sativa* de los mutantes en el gen *nolG* frente a los parentales.

5.4.1 Ensayos de competitividad en *M. sativa*

Los ensayos de competitividad realizados mostraron claramente una mayor capacidad competitiva del mutante SVQ749 frente a la estirpe SVQ747 pGUS3, observándose que más del 75% de los nódulos estaban ocupados por la cepa mutante. El porcentaje de competitividad de SVQ747 frente a la estirpe SVQ747 pGUS3 estuvo cercano al 38%, (Tabla 28).

Sin embargo, los resultados obtenidos con *E. medicae* SVQ748 fueron distintos, observándose porcentajes de competitividad tanto del parental como del mutante frente a la estirpe SVQ748 pGUS3 bastante similares, en torno al 35%, (Tabla 27).

Tabla 27. Porcentaje de competitividad de la estirpe silvestre *E. medicae* SVQ748 y su derivado mutante en el gen *nolG*, SVQ750, frente a la cepa SVQ748 pGUS3

ESTIRPE	% DE COMPETITIVIDAD FRENTE A SVQ748 pGUS3
SVQ748	32,8
SVQ750	37,5

Para continuar con el estudio de la implicación del gen *nolG* en la simbiosis se decidió seleccionar *E. meliloti*, SVQ747 y su mutante SVQ749 dado el mayor impacto sobre la competitividad por la nodulación de la alfalfa mostrados por el mutante SVQ749.

Por este motivo, se realizaron ensayos de competitividad con *E. meliloti* SVQ747 y su derivada SVQ749, así como con esta última estirpe portadora del plásmido pMUS1306, con una copia silvestre del gen *nolG*, además de las estirpes parental y mutante portadoras del plásmido pBBR1MCS-2 como control. Los resultados (Tabla 26 y Figura 49) mostraron que la presencia del plásmido pBBR1MCS-2 no alteró la capacidad competitiva de SVQ747 ni la del mutante SVQ749, que continuó siendo más competitivo que la estirpe silvestre; mientras que cuando a dicho mutante se le transfirió el plásmido pMUS1306 (pBBR1MCS-2 portador del gen *nolG* bajo un promotor constitutivo) perdió su mayor capacidad competitiva.

Tabla 28. Porcentaje de competitividad de la estirpe SVQ747, el mutante SVQ749 y sus derivados portadores de los plásmidos pBBR1MCS-2 y pMUS1306

ESTIRPE	% DE COMPETITIVIDAD FRENTE A SVQ747 pGUS3
SVQ747	37,9 ± 3,3 A
SVQ747 pBBR1MCS-2	47,6
SVQ749	77,2 ± 0,5 B
SVQ749 pBBR1MCS-2	89,5
SVQ749 pMUS1306	57,4

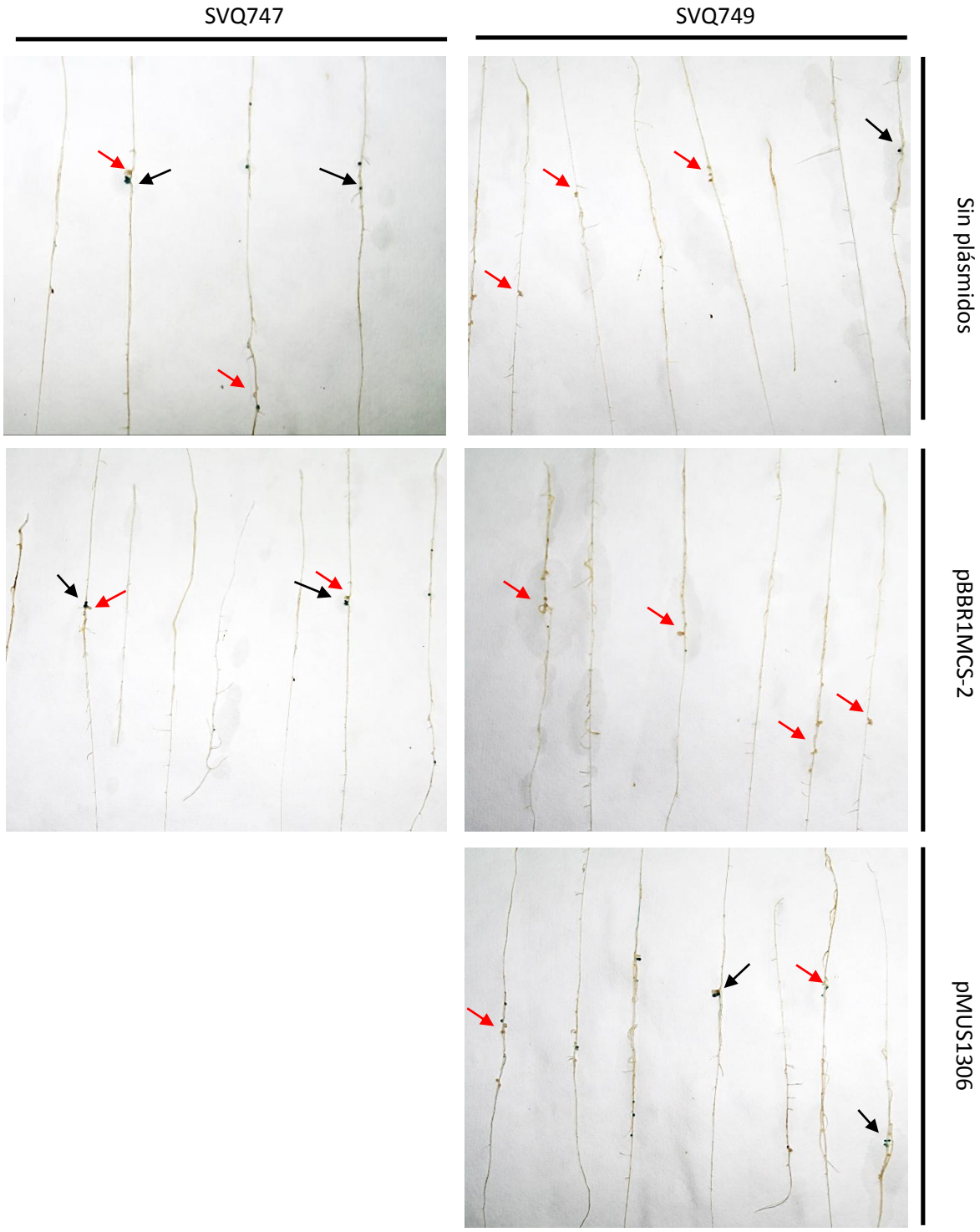


Figura 49. Ensayo de competitividad de SVQ747 y sus derivados frente a la estirpe SVQ747 pGUS3, donde se aprecian los nodulos azules formados por la estirpe SVQ747 pGUS3 (Flechas negras), y los nodulos blancos formados por la estirpe que compite con SVQ747 pGUS3 en cada caso (flechas rojas).

5.4.2 Ensayos de cinética de nodulación en *M. sativa*

Otra de las características que podía aportar información sobre el efecto de la mutación en el gen *nolG* en la simbiosis, es el estudio de la cinética de nodulación de la cepa parental SVQ747 en comparación con el mutante *nolG*, SVQ749. Los resultados obtenidos (Figura 50) indicaron que, en los primeros días tras la inoculación, el mutante SVQ749 presentó más facilidad para la formación de nódulos, siendo el número de nódulos por planta más alto que en el parental, desde el sexto día tras la inoculación y manteniéndose durante el resto del experimento, donde las diferencias alcanzadas fueron estadísticamente significativas, (Tabla 29).

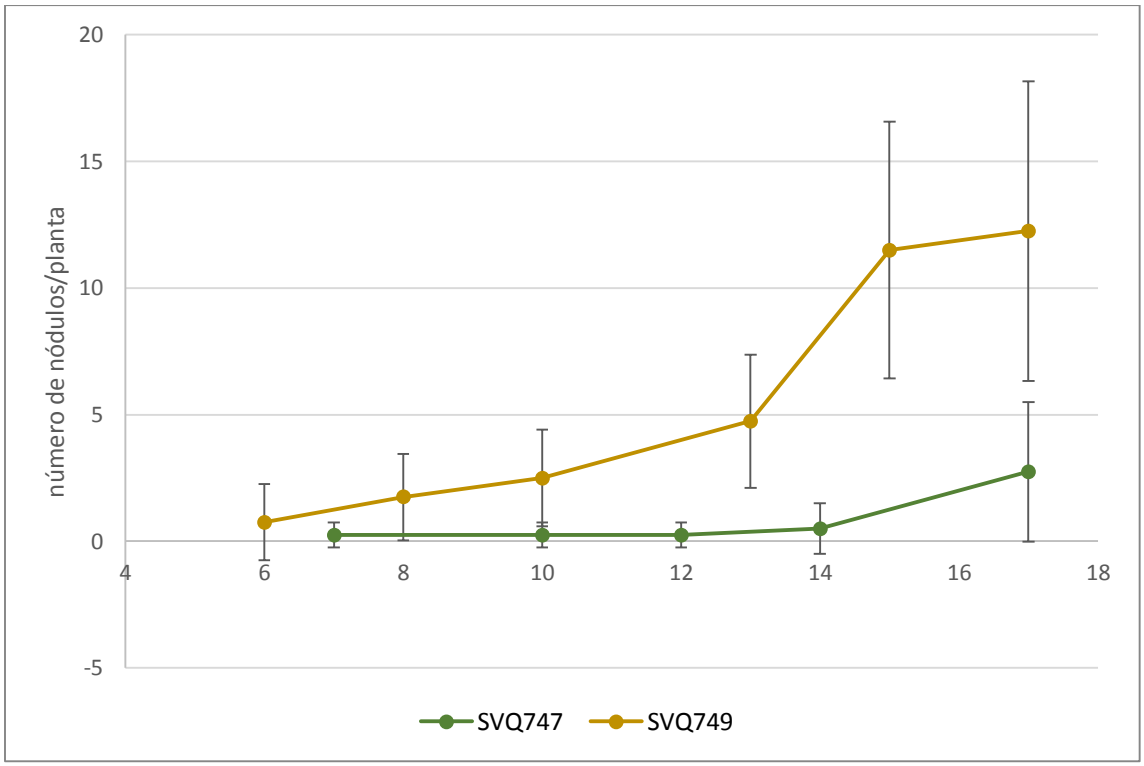


Figura 50. Número de nódulos por planta de *M. sativa* inoculadas con *E. meliloti* SVQ747 y su derivado SVQ749.

Tabla 29. Número de nódulos por planta de *M. sativa* formados por las estirpes SVQ747 y SVQ749 pasados 10 y 17 días de la inoculación.

Número de nódulos por planta			
SVQ747 10 dpi	**SVQ749 10 dpi**	**SVQ747 17 dpi**	**SVQ749 17 dpi**
0,25 ± 0,5 A	2,5 ± 1,9 A	2,8 ± 2,8 A	12,3 ± 5,9 B

Las cifras seguidas de una misma letra, dentro de cada columna, no difieren significativamente al nivel del 5%.

Paralelamente, cuando se analizaron los datos del número de nódulos por planta formados por SVQ749 pMUS1306 y su control SVQ749 pBBR1MCS-2 en comparación a SVQ747 y su mutante SVQ479, se observó que la estirpe SVQ749 pMUS1306 presentó un retraso en la nodulación con respecto a SVQ749 pBBR1MCS-2, que a su vez fue más rápido que SVQ747 en los primeros días, (Figura 51). Estadísticamente se observaron diferencias significativas entre SVQ749 y SVQ749 pBBR1MCS-2 con respecto a SVQ747 y SVQ749 pMUS1306. Sin embargo, a los 17 días el único cuya diferencia es estadísticamente significativa fue SVQ749, presentado un numero de nódulos por planta marcadamente superior al del resto de estirpes, (Tablas 30 y 31).

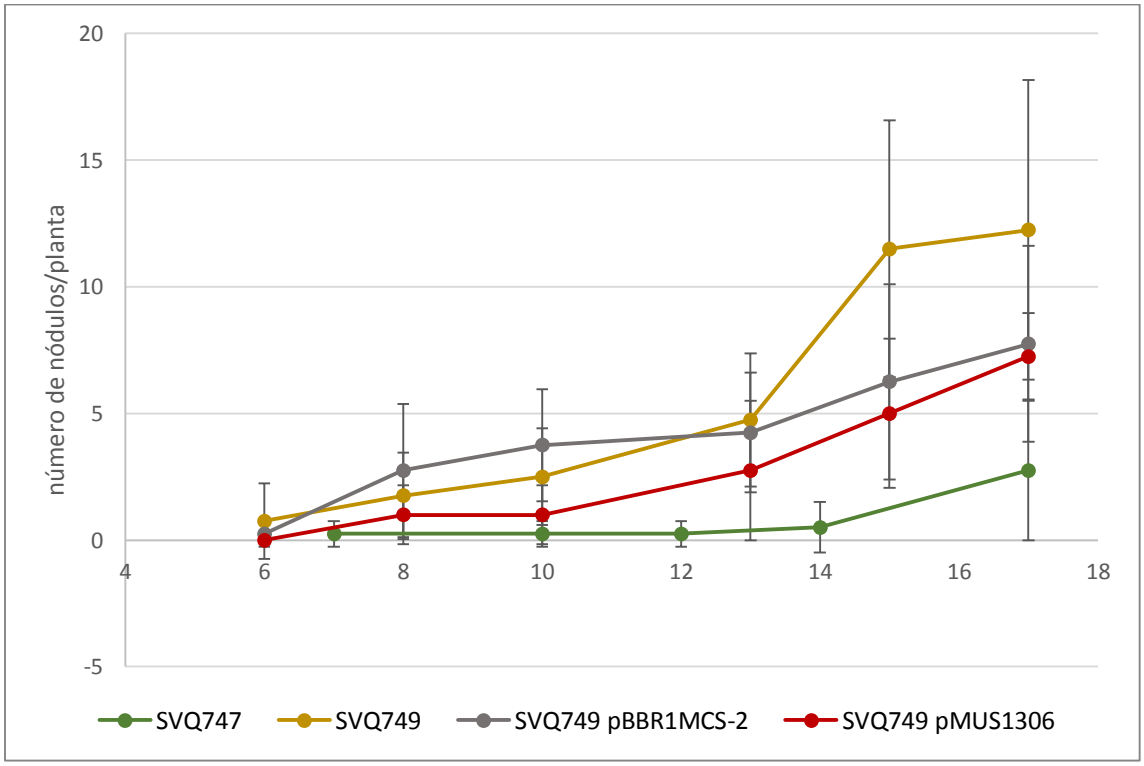


Figura 51. Número de nódulos por planta de *M. sativa* inoculadas con *E. meliloti* SVQ747 y sus derivados SVQ749, SVQ749 pBBR1MCS-2 y SVQ749 pMUS1306.

Tabla 30. Número de nódulos por planta de *M. sativa* formados por las estirpes SVQ747 y SVQ749, SVQ749 pBBR1MCS-2 y SVQ749 pMUS1306 pasados 10 días de la inoculación.

Número de nódulos por planta 10 dpi			
SVQ747	**SVQ749**	**SVQ749 pBBR1MCS-2**	**SVQ749 pMUS1306**
0,3 ± 0,5 A	2,5 ± 1,9 AB	3,8 ± 2,2 B	1 ± 1,2 A

Las cifras seguidas de una misma letra, dentro de cada columna, no difieren significativamente al nivel del 5%.

Tabla 31. Número de nódulos por planta de *M. sativa* formados por las estirpes SVQ747 y SVQ749, SVQ749 pBBR1MCS-2 y SVQ749 pMUS1306 pasados 17 días de la inoculación.

Número de nódulos por planta 17 dpi			
SVQ747	**SVQ749**	**SVQ749 pBBR1MCS-2**	**SVQ749 pMUS1306**
2,8 ± 2,8 A	12,3 ± 5,9 B	7,8 ± 3,9 A	7,3 ± 1,7 A

Las cifras seguidas de una misma letra, dentro de cada columna, no difieren significativamente al nivel del 5%.

5.4.3 Ensayos de eficiencia de SVQ747 y sus derivados en *M. sativa*

Se han realizado ensayos de eficiencia de *E. meliloti* SVQ747, SVQ749, SVQ749 pBBR1MCS-2 y SVQ749 pMUS1306 en plantas de alfalfa analizando el número de nódulos y el peso seco de los mismos, así como el peso seco la parte aérea de las plantas. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados en ninguna de las cepas, (Tabla 32).

Tabla 32. Eficiencia, peso seco de la parte aérea, número de nódulos y peso seco de los nódulos de la estirpe *E. meliloti* SVQ747 y sus derivados.

ESTIRPE	PESO SECO PARTE AÉREA (mg)	NÚMERO DE NÓDULOS	PESO SECO DE LOS NÓDULOS (mg)
SVQ747	135 ± 82,7 A	48,3 ± 22,1 A	16,9 ± 10,7 A
SVQ749	172,5 ± 59,1 A	53 ± 12,2 A	19,9 ± 7,2 A
SVQ749 pBBR1MCS-2	152,5 ± 67 A	42,3 ± 7,1 A	12,2 ± 8,1 A
SVQ749 pMUS1306	187,5 ± 33 A	45 ± 7,3 A	15,1 ± 1,9 A

Las cifras seguidas de una misma letra, dentro de cada columna, no difieren significativamente al nivel del 5%.

5.4.4. Estudios de adhesión- colonización a las raíces de alfalfa por *E. meliloti* SVQ747 y su derivado SVQ749

La capacidad colonizadora de la bacteria en los primeros días tras la inoculación puede ser clave para que una estirpe sea más competitiva, por ello se han realizado experimentos de adhesión colonización de las raíces de la alfalfa a las 2, 24, 48 y 72 horas tras la inoculación de la estirpe parental SVQ747 y SVQ749, haciendo una rotura mecánica de la raíz para separar a las bacterias íntimamente adheridas. Los resultados mostraron que el mutante SVQ749, mostró un número de bacterias adheridas a la raíz un orden de magnitud superior al que presentó el parental a las 24 y 48 horas, siendo de casi dos órdenes de magnitud de diferencia a las 72 horas. (Tabla 33).

Tabla 33. Número de bacterias por gramo de peso fresco de raíz. Resultados obtenidos rompiendo mecánicamente las raíces para separar las bacterias adheridas.

ESTIRPE	2 hpi (ufc/gpfr)	24 hpi (ufc/gpfr)	48 hpi (ufc/gpfr)	72 hpi (ufc/gpfr)
SVQ747	$3{,}9 \times 10^3$	$5{,}9 \times 10^3$	$6{,}9 \times 10^3$	1×10^4
SVQ749	$4{,}5 \times 10^3$	$4{,}95 \times 10^4$	$5{,}3 \times 10^4$	$9{,}8 \times 10^5$

6 Expresión génica

6.1 Estudio de la inducción por luteolina del gen *nodA* de *E. meliloti* SVQ747 mediante *q*PCR

Con el objeto de comprobar si la luteolina induce la expresión de los genes de nodulación en *E. meliloti* SVQ747, se realizaron experimentos de *q*PCR para conocer la expresión del gen *nodA* en presencia y ausencia de luteolina (1 μg. ml^{-1}). Para ello se diseñaron los cebadores qnodAF y qnodAR sobre la secuencia del gen *nodA* de *E. meliloti* 1021. Los resultados demostraron que este flavonoide funcionó como inductor del gen *nodA* en esta cepa de *E. meliloti*, ya que en el silvestre se obtuvieron niveles de inducción estadísticamente significativos, seis veces en presencia de luteolina frente al control sin luteolina, (Figura 52).

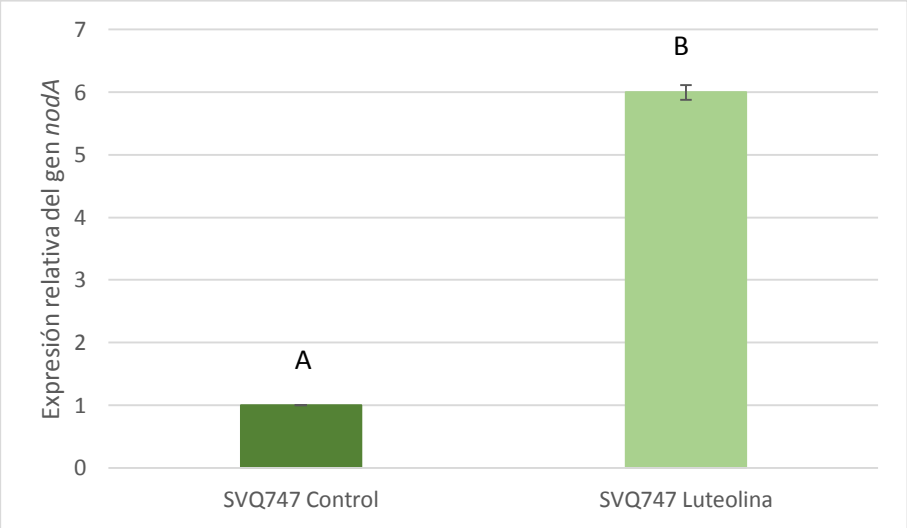


Figura 52. Expresión relativa del gen *nodA* mediante qPCR en la estirpe *E. meliloti* SVQ747 en presencia y ausencia de luteolina (1 μg ml^{-1}). Las columnas con una misma letra no difieren significativamente al nivel del 5%.

6.2 Estudio de la inducción por luteolina en el gen *nodA* de *E. meliloti* SVQ749 mediante *q*PCR

Para comprobar si existían cambios en la inducción de los genes *nod* entre la estirpe parental y el mutante por inserción en el gen *nolG*, se realizaron experimentos de *q*PCR utilizando los cebadores qnodAF y qnodAR. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto una mayor expresión del gen *nodA* en el mutante SVQ749 que en el parental SVQ747, (Figura 53).

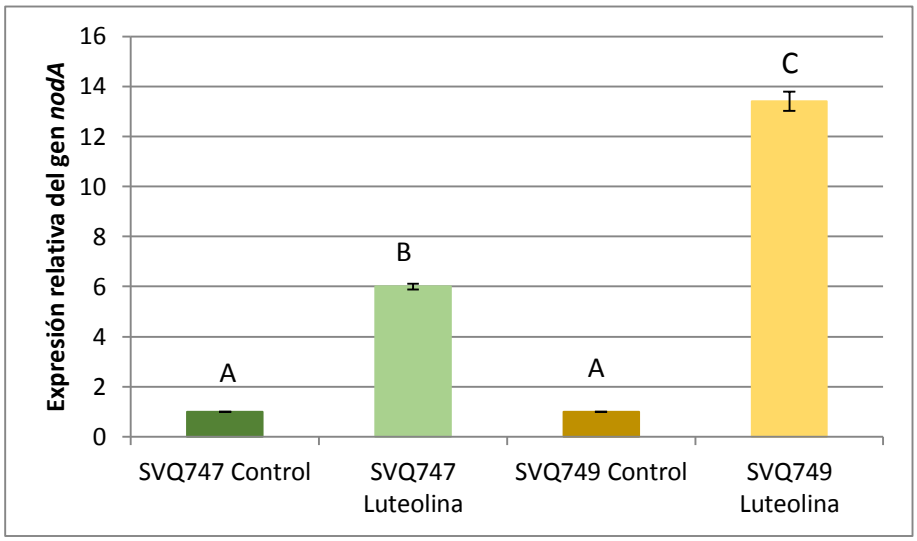


Figura 53. Expresión relativa del gen *nodA* en presencia y ausencia de luteolina (1 μg ml^{-1}) en las estirpes SVQ747 y SVQ749. Las columnas con una misma letra no difieren significativamente al nivel del 5%.

6.3 Estudio de la expresión de los genes *nolG y nodN* en presencia de luteolina mediante *q*PCR

En la bibliografía se describe que la expresión del operón *nodMnolFGnodN* es dependiente de luteolina, (Baev *et al*., 1991). Por este motivo, se han realizado experimentos de *q*PCR en los que se podrá ver la expresión de dicho gen en presencia del flavonoide. Para ello se diseñaron los cebadores qnolG-F2 y qnolG-R2 usando como referencia la secuencia del gen *nolG* de la estirpe silvestre *E. meliloti* SVQ747. Los resultados han puesto de manifiesto la inducción del gen *nolG* mediada por luteolina, obteniéndose una ligera inducción de ~2,5 veces más expresión del gen en la estirpe parental con luteolina que sin el flavonoide, (Figura 54).

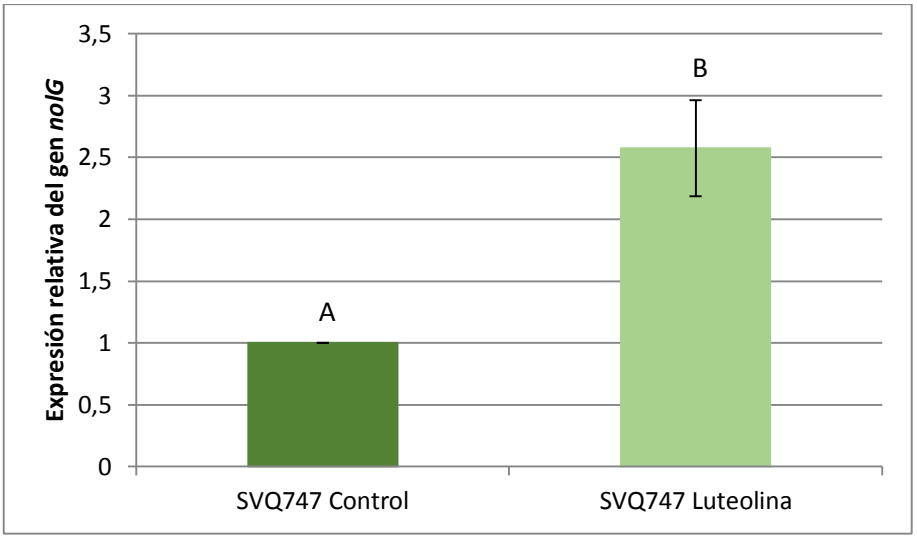


Figura 54. Expresión relativa del gen *nolG* en la estirpe SVQ747 en presencia de luteolina. Las columnas con una misma letra no difieren significativamente al nivel del 5%.

Por otro lado, también se estudió la expresión del gen *nodN* en la estirpe parental en presencia de luteolina mediante *q*PCR, empleando los cebadores qnodN ORT12F y qnodN ORT12R. Se observó un leve incremento de la expresión frente al control sin flavonoides; pero esa expresión, que no se considera estadísticamente significativa, fue inferior a la del gen *nolG,* (Figura 55).

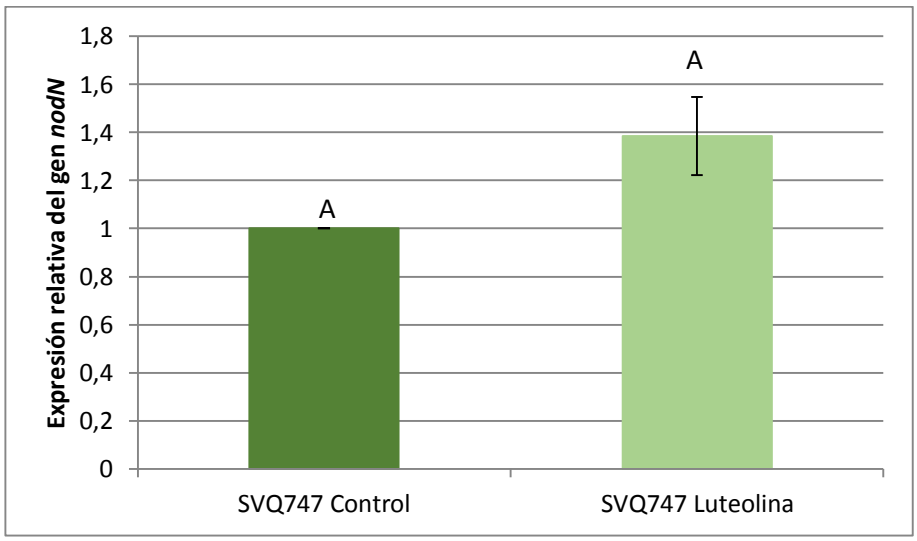


Figura 55. Expresión relativa del gen *nodN* en la estirpe SVQ747 en presencia de luteolina (1 µg ml^{-1}). Las columnas con una misma letra no difieren significativamente al nivel del 5%.

Cabía la posibilidad de que el fenotipo observado en el mutante SVQ749 se debiera a un posible efecto polar que la inserción del casete *lacZ*-Gm estuviera ejerciendo sobre el gen que se encuentra corriente abajo en el operón, *nodN*. Una de las vías para comprobar este posible efecto polar, sería ver la expresión del gen *nodN* en el mutante SVQ749 mediante experimentos de *q*PCR. Los resultados mostraron que la expresión del gen *nodN* en presencia de luteolina en la cepa SVQ749 fue, aproximadamente, la mitad de la encontrada en la estirpe parental, aunque esta diferencia no se puede considerar estadísticamente significativa, (Figura 56).

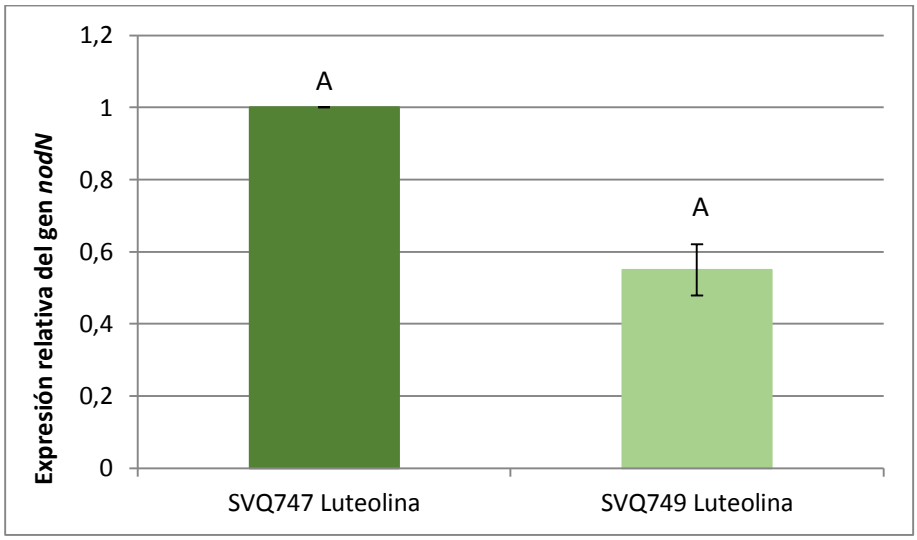


Figura 56. Expresión relativa del gen *nodN* en las estirpes SVQ747 y SVQ749 en presencia de luteolina (1 µg ml^{-1}). Las columnas con una misma letra no difieren significativamente al nivel del 5%.

7. Posible efecto polar sobre el gen *nodN* de la mutación por inserción en el gen *nolG* en SVQ749

Para determinar de forma más clara el papel de NolG en el fenotipo simbiótico observado en el mutante SVQ749, se construyó y estudió un mutante en el gen *nolG* por deleción en fase.

7.1 Construcción de un mutante delecionado en el gen *nolG* de la estirpe SVQ747

La construcción del mutante en el gen *nolG* se realizó mediante el método de deleción por PCR solapante. Para ello se diseñaron cuatro cebadores: nolG-AF, secuencia homóloga a un fragmento de ADN situado corriente arriba del gen *nolG* y que porta la diana de restricción para la enzima *Eco*RI; nolG-BR, secuencia complementaria a la del cebador nolG-CF; nolG-CF, secuencia homóloga a un fragmento de 14 nucleótidos

localizado en el comienzo del gen *nolG* seguido de otro de la misma longitud localizado al final del mismo gen y nolG-DR, secuencia complementaria a un fragmento de ADN situado aguas abajo del gen *nolG* y porta la diana de restricción para la enzima *Hind*III. En primer lugar, se realizó una PCR utilizando como ADN molde el ADN genómico de la estirpe SVQ747 y los cebadores nolG-AF y nolG-BR para amplificar un fragmento de 500 pb. A continuación, se realizó una segunda PCR con el ADN genómico de SVQ747 y los cebadores nolG-CF y nolG-DR y se amplificó un fragmento de 500 pb. Por último, en la tercera PCR se utilizó como ADN molde los dos fragmentos obtenidos anteriormente y los cebadores nolG-AF y nolG-DR. De esta forma se amplificó un fragmento de 1 kb que portaba las secuencias corriente arriba y abajo del gen *nolG*, y que presentaba una deleción de 3198 pb, como se comprobó mediante la secuenciación del fragmento de 1 kb. Dicho fragmento se digirió con las enzimas *Eco*RI/*Hind*III, y fue clonado en el vector suicida en los rizobios pK18*mobsacB* digerido con las mismas enzimas de restricción. De esta forma se generó el plásmido pMUS1326. Por último, este plásmido se homogenotizó en la estirpe parental SVQ747 y de esta forma se obtuvo el mutante SVQ761 (= SVQ747 Δ*nolG*) (Figura 57).

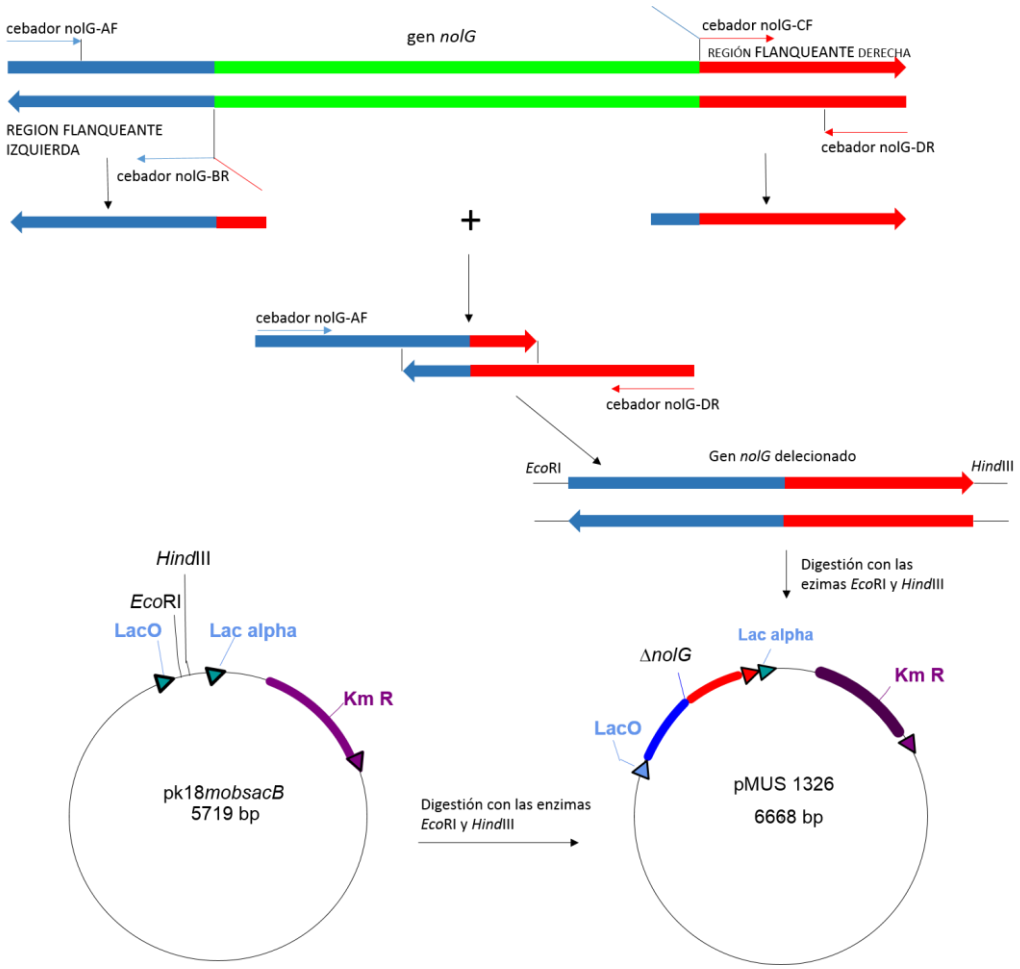


Figura 57. Construcción del plásmido pMUS1326 mediante PCR solapante para la obtención del mutante por deleción en *nolG* en *E. meliloti* SVQ747.

La homogenotización de la mutación se confirmó mediante hibridación en *Southern*, digiriendo el ADN total de la estirpe parental SVQ747 y del mutante por deleción SVQ761 con la enzima *Sph*I. Como sonda de hibridación se usó el producto de PCR amplificado con los cebadores nolG-AF y nolG-DR, que lleva incorporado nucleótidos marcados con digoxigenina. Mediante el ensayo de hibridación se comprobó que la estirpe mutante SVQ761 presentaba una única banda ~3,2 kb menor a la única banda de la estirpe silvestre, correspondiente a la deleción del gen *nolG*, (Figura 58).

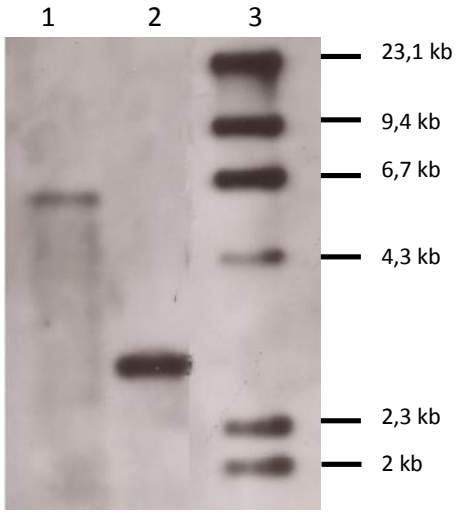


Figura 58. Hibridación Southern para la comprobación del mutante por deleción del gen *nolG*, SVQ761. Carril 1: SVQ747; carril 2: SVQ761; carril 3: marcador λ *Hind*III.

Además, a este mutante, se le transfirió por conjugación el plásmido pMUS1306 que lleva una copia del gen *nolG* silvestre, obteniéndose así la estirpe SVQ761 pMUS1306 (Figura 30).

8. Caracterización del mutante por deleción del gen *nolG* en la estirpe SVQ747 de *E. meliloti*

8.1 Fenotipo en respuesta a metales pesados

En primer lugar, se realizaron estudios para conocer la resistencia del mutante por deleción en el gen *nolG*, SVQ761, a concentraciones fijadas de los metales pesados Cd y Zn, en comparación con la cepa parental SVQ747, y se determinó cómo afectan éstos al crecimiento, mediante la realización de curvas de crecimiento en presencia de estos metales pesados.

8.1.1 Tolerancia a metales pesados

Se han hecho varios experimentos para conocer la tolerancia a determinadas concentraciones de metales en función del diámetro del halo de inhibición producido por el metal por el método de difusión en placa. De esta forma se ha observado que el mutante SVQ761 presentó toolerancias similares a los metales y concentraciones estudiadas que la cepa parental SVQ747, puesto que los diámetros de los halos de

inhibición formados no presentaron diferencias estadísticamente significativas, (Tabla 34).

Tabla 34. Medida en milímetros del diámetro del halo de inhibición formado por diferentes concentraciones en metales pesados en la estirpe *E. meliloti* SVQ747 y su correspondiente mutante en el gen *nolG* por delceión SVQ761.

Estirpe	Cu ($CuSO_4$) 500 mM (mm)	Zn ($ZnSO_4$) 500 mM (mm)	Cd ($CdCl_2$) 100 mM (mm)	Co ($CoCl_2$) 100 mM (mm)	Ni ($NiCl_2$) 200 mM (mm)
SVQ747	10,5 ± 0,5 A	15,2 ± 1,1 A	10,7 ± 0,6 A	10,2 ± 0,4 A	13,5 ± 0,2 A
SVQ761	10 ± 0,9 A	16 ± 0,6 A	11,3 ± 0,6 A	10,2 ± 1 A	13,3 ± 0,5 A

8.1.2 Curvas de crecimiento en presencia de metales pesados

Por otro lado, se han realizado curvas de crecimiento en presencia de $CdCl_2$ 0,2 mM y de $ZnSO_4$ 0,56 mM, para comparar, frente a la estirpe parental, si el mutante por deleción está afectado en el crecimiento en estas condiciones. Se observó que parental, SVQ747, y mutante, SVQ761, así como SVQ761 pMUS1306 tenían un comportamiento parecido, mostrando ambos tiempos de generación bastante similares en las curvas de crecimiento, (Figuras 59 y 60).

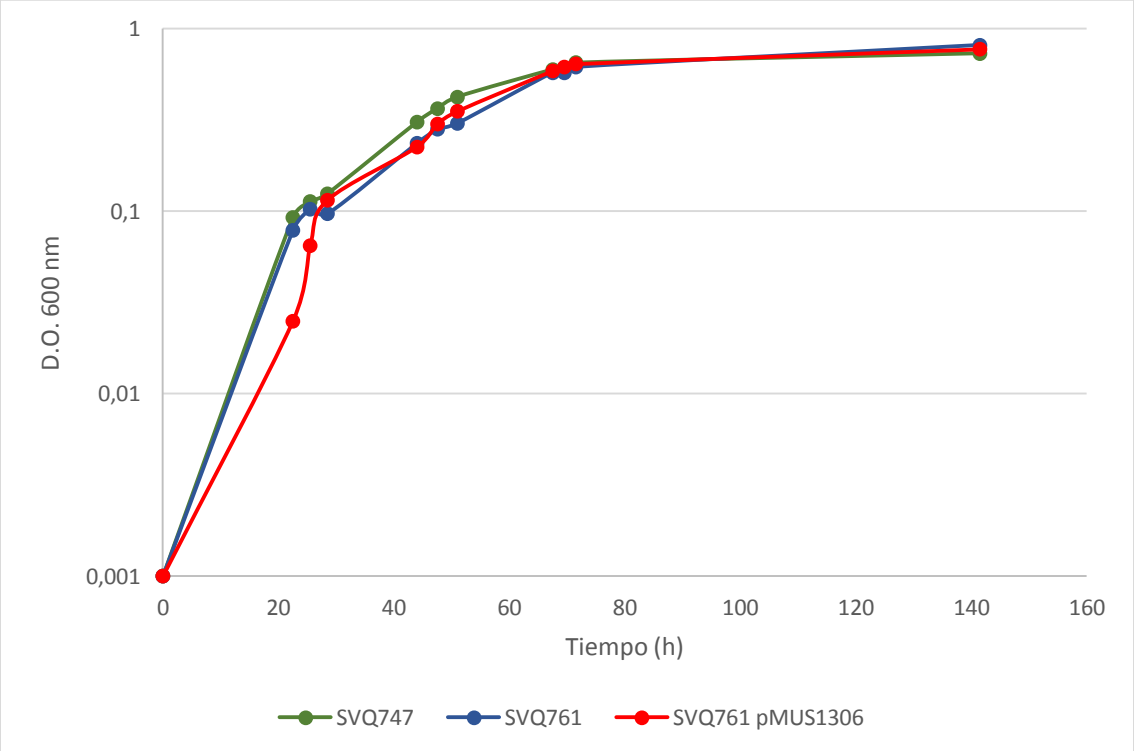


Figura 59. Curva de crecimiento de SVQ747 y sus derivados SVQ761 y SVQ761 pMUS1306 en medio TY suplementado con $CdCl_2$ 0,2 mM.

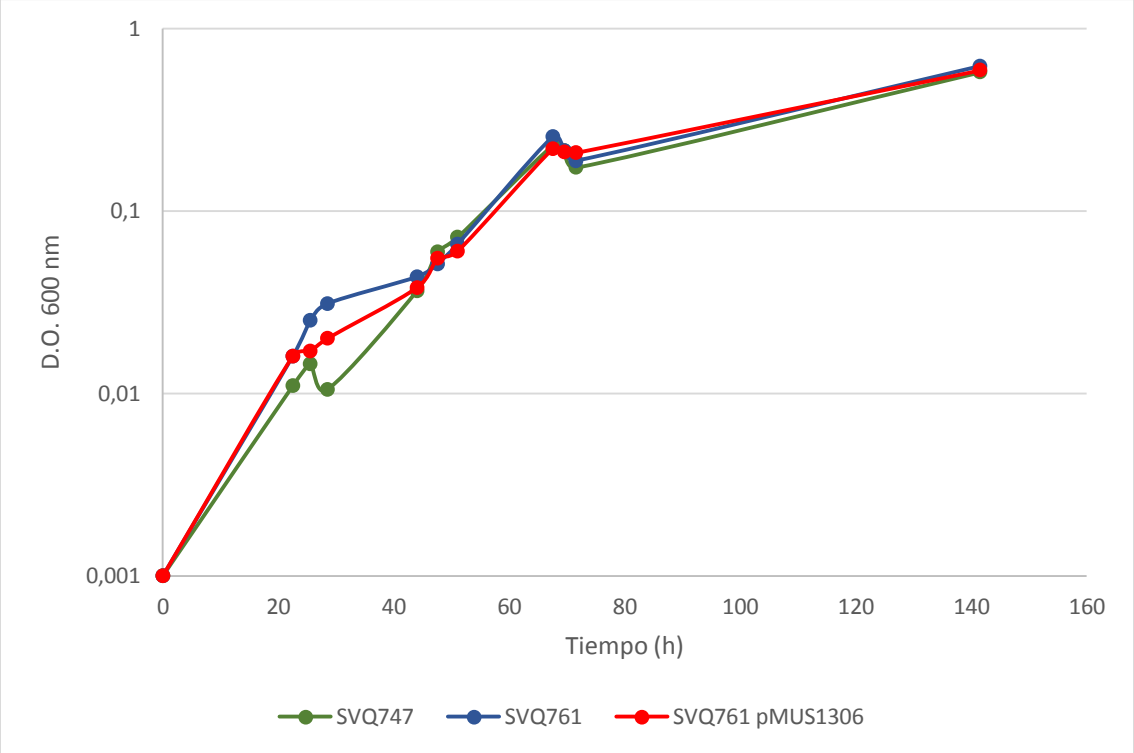


Figura 60. Curva de crecimiento de SVQ747 y sus derivados SVQ761 y SVQ761 pMUS1306 en medio TY suplementado con $ZnSO_4$ 0,56 mM.

8.2 Fenotipo en movilidad de tipo *swimming* del mutante SVQ761

Al igual que se hizo con el mutante por inserción, también se ha estudiado la movilidad de tipo *swimming* del mutante por deleción frente a la estirpe parental. En este caso, también se han hecho curvas de crecimiento en medio Bromfield, para descartar que cualquier diferencia de movilidad encontrada pudiera deberse a una diferencia de crecimiento, (Figura 61). Tras comprobar que no existían diferencias de crecimiento, se llevaron a cabo los experimentos de la movilidad de tipo *swimming* en medio Bromfield (0,3% de agar) y con kanamicina (60 µg ml^{-1}) en el caso de las estirpes portadoras de plásmidos pBBR1MCS-2 o derivados. Los resultados mostraron una ligera reducción no significativa de la movilidad *swimming* en el mutante por deleción SVQ761 con respecto a la cepa parental SVQ747, (Figura 62). Por otro lado, en los experimentos de movilidad en medio con kanamicina de la estirpe SVQ761 portando el plásmido pMUS1306 (usando como control a SVQ761 con el plásmido pBBR1MCS-2) se ha visto que la presencia del gen *nolG* bajo un promotor constitutivo, no provocó aumento de la movilidad, sino por el contrario, tendió a reducirla, (Figura 63).

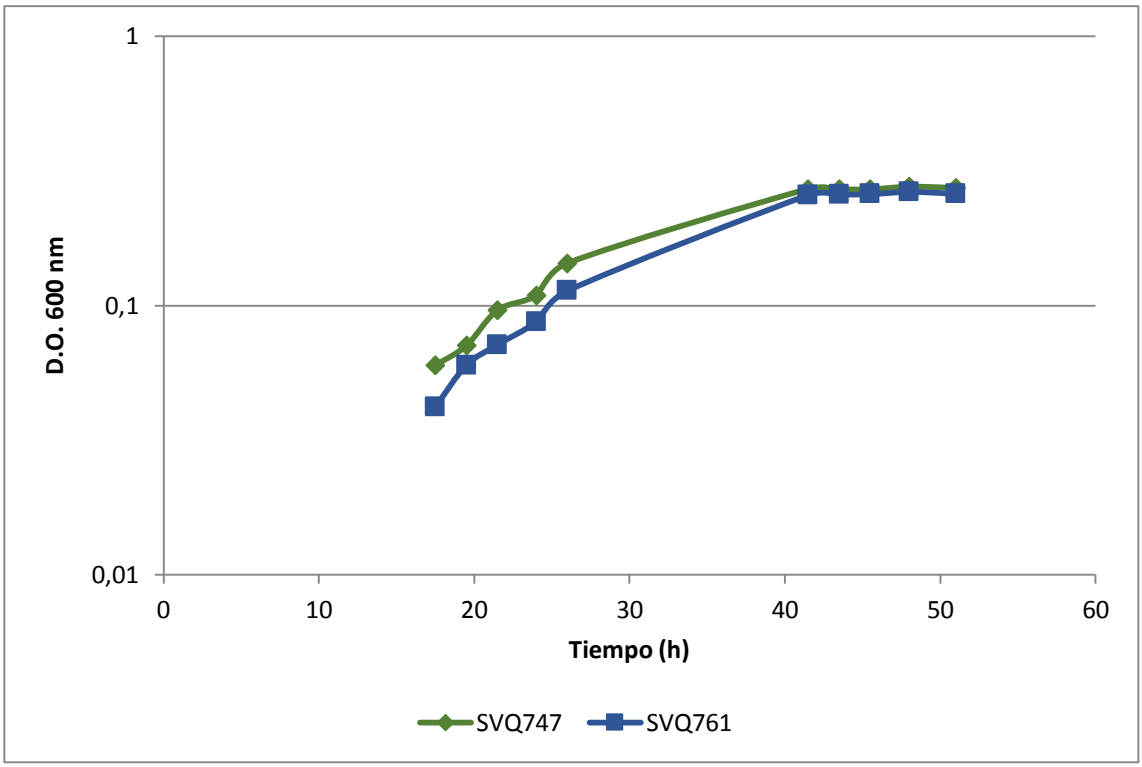


Figura 61. Curva de crecimiento en medio Bromfield de la estirpe parental SVQ747 y el mutante SVQ761.

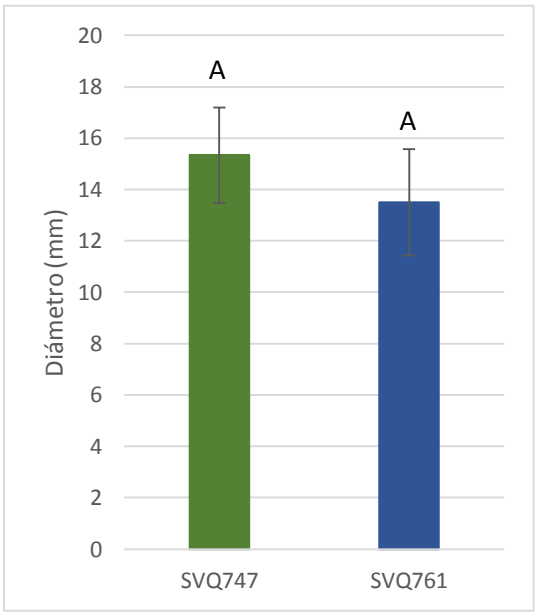


Figura 62. Movilidad de tipo *swimming*, en medio Bromfield 0,3% de agar, medida según el diámetro en mm del halo de movilidad, en la estirpe parental SVQ747 y su mutante delecionado SVQ761. Las columnas con una misma letra no difieren significativamente al nivel del 5%.

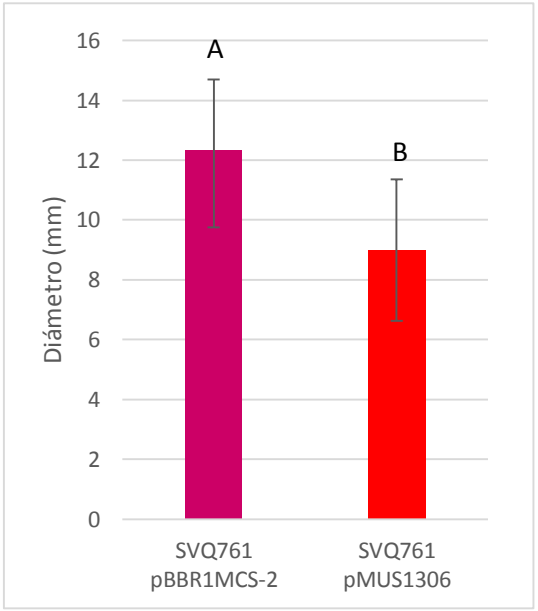


Figura 63. Movilidad de tipo *swimming*, en medio Bromfield 0,3% de agar y kanamicina 60 µg ml^{-1}, medida según el diámetro en mm del halo de movilidad, en las estirpes SVQ761 pBBr1MCS-2 y SVQ761 pMUS1306. Las columnas con una misma letra no difieren significativamente al nivel del 5%.

8.3 Fenotipo simbiótico

8.3.1 Ensayos de eficiencia del mutante SVQ761

Se han llevado a cabo ensayos de eficiencia, de *E. meliloti* SVQ747 y sus derivados mutados por deleción en el gen *nolG*. Los resultados mostraron que, en cuanto al peso seco de la parte aérea de la planta, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre la estirpe SVQ747 y su derivado mutante SVQ761, así como tampoco se encontraron diferencias al comparar este dato en la estirpe mutante portadora del plásmido pBBR1MCS-2, ni con aquella que expresa constitutivamente el gen *nolG*. Del mismo modo tampoco se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en el número de nódulos ni en el peso seco de los mismos, (Tabla 35).

Tabla 35. Eficiencia, peso seco de la parte aérea, número de nódulos y peso seco de los nódulos de la estirpe *E. meliloti* SVQ747 y sus derivados.

ESTIRPE	PESO SECO PARTE AÉREA (mg)	NÚMERO DE NÓDULOS	PESO SECO DE LOS NÓDULOS (mg)
SVQ747	163,3 ± 73,7 A	55,3 ± 20,7 A	20,8 ± 8,9 A
SVQ761	147,5 ± 70,9 A	51,5 ± 18,5 A	17,6 ± 10,5 A
SVQ761pBBR1MCS-2	125 ± 46,5 A	42,3 ± 11,2 A	14 ± 7,3 A
SVQ761 pMUS1306	137,5 ± 28,7 A	33,3 ± 18,1 A	8 ± 4,2 A

Las cifras seguidas de una misma letra, dentro de cada columna, no difieren significativamente al nivel del 5%.

8.3.2 Ensayos de competitividad por la nodulación en *M. sativa* del mutante por deleción del gen *nolG*

Se han realizado experimentos de competitividad del mutante SVQ761 frente SVQ747 pGUS3, en *M. sativa*. Los resultados (Tabla 36) mostraron que el mutante por deleción es más competitivo (60%) que la estirpe parental SVQ747, frente a SVQ747 pGUS3, como ocurría en el caso del mutante en el gen *nolG* por inserción, SVQ749, aunque en este último la diferencia era más acusada. El resultado más sorprendente ha sido la influencia del plásmido pBBR1MCS-2 disminuyendo la competitividad de la estirpe SVQ761, (Figura 64), mientras que no ha tenido efecto en la cepa SVQ747, ni lo tuvo en el caso del mutante por inserción SVQ749, (Tabla 28).

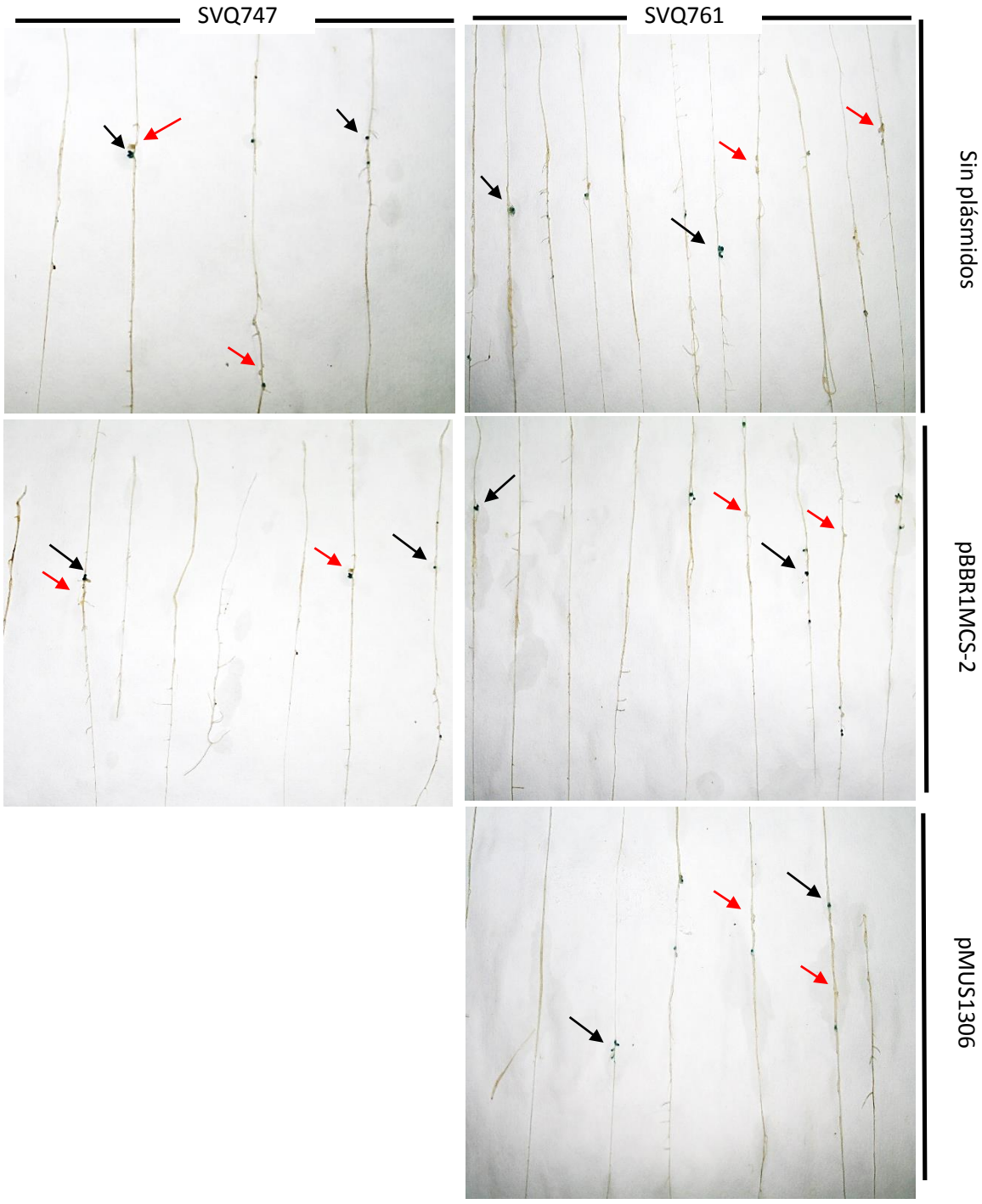


Figura 64. Ensayo de competitividad de SVQ747 y sus derivados frente a la estirpe SVQ747 pGUS3, donde se aprecian los nodulos azules formados por la estirpe SVQ747 pGUS3 (Flechas negras), y los nodulos blancos formados por la estirpe que compite con SVQ747 pGUS3 en cada caso (flechas rojas).

Tabla 36. Porcentaje de competitividad frente a la cepa parental SVQ747

ESTIRPE	% DE COMPETITIVIDAD FRENTE A SVQ747 pGUS3
SVQ747	37,9 ± 3,3 A
SVQ 747 pBBR1MCS-2	47,6
SVQ761	60,6 ± 10,9 B
SVQ761 pBBR1MCS-2	36
SVQ761 pMUS1306	38

8.3.3 Ensayos de cinética de nodulación de la alfalfa

Los ensayos de cinética de nodulación del mutante por deleción en *nolG*, SVQ761 frente a SVQ747, mostraron una tendencia a mayor rapidez del mutante en la formación de nódulos en los primeros días tras la inoculación, (Figura 65), pero sin presentar diferencias estadísticamente significativas, (Tabla 37). Esa tendencia que presentó SVQ761 fue más acusada en el mutante por inserción SVQ749, cuyas diferencias con el parental y con el mutante por deleción sí fueron estadísticamente significativas a los 17 días después de la inoculación.

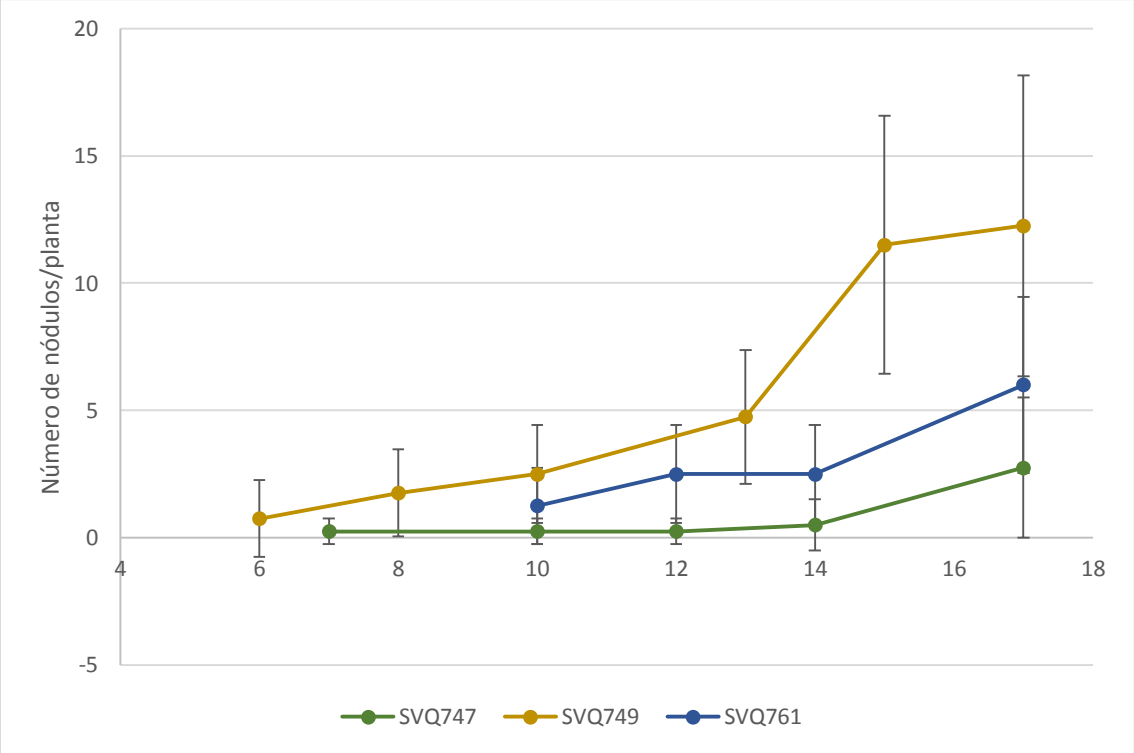


Figura 65. Número de nódulos por planta de *M. sativa* inoculadas con *E. meliloti* SVQ747 y sus derivados SVQ749 y SVQ761.

Tabla 37. Número de nódulos por planta de *M. sativa* formados por las estirpes SVQ747 y SVQ749 pasados 10 y 17 días de la inoculación

Número de nódulos por planta					
SVQ747 10 dpi	**SVQ 749 10 dpi**	**SVQ761 10 dpi**	**SVQ747 17 dpi**	**SVQ749 17 dpi**	**SVQ761 17 dpi**
0,3 ± 0,5 A	2,5 ± 1,9 A	1,3 ± 1,5 A	2,8 ± 2,8 A	12,3 ± 5,9 B	6 ± 3,5 A

Las cifras seguidas de una misma letra, dentro de cada columna, no difieren significativamente al nivel del 5%.

La estirpe SVQ761 pMUS1306 presentó una tendencia a desarrollar mayor número de nódulos que su control SVQ761 pBBR1MCS-2, situándose ambas cepas por debajo del número de nódulo del mutante SVQ761 y mostrando mayor numero que la estirpe parental SVQ747. Estas diferencias mostradas entre las cuatro estirpes no se consideran estadísticamente significativas ni a los 10, ni a los 17 días tras la inoculación, (Figura 66 y Tablas 38 y 39).

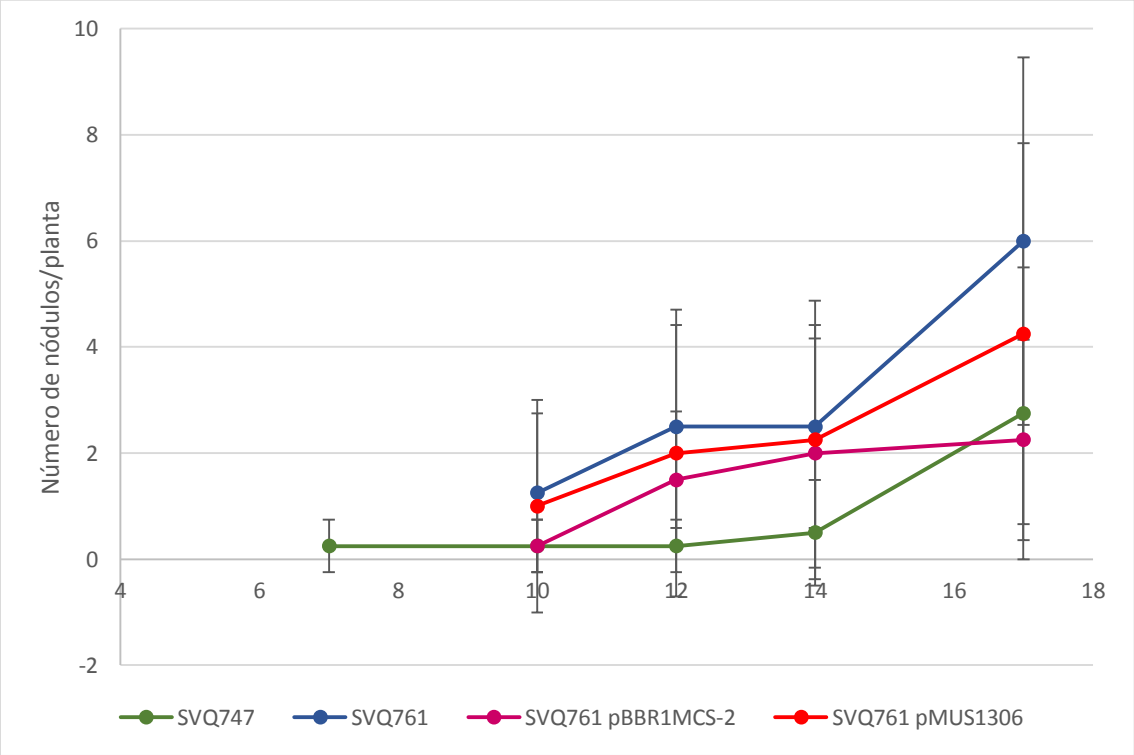


Figura 66. Número de nódulos por planta de *M. sativa* inoculadas con *E. meliloti* SVQ747 y sus derivados SVQ761, SVQ761 pBBR1MCS-2 y SVQ761 pMUS1306.

Tabla 38. Número de nódulos por planta de *M. sativa* formados por las estirpes SVQ747 y SVQ761, SVQ761 pBBR1MCS-2 y SVQ761 pMUS1306 pasados 10 días de la inoculación.

Número de nódulos por planta 10 dpi			
SVQ747	**SVQ761**	**SVQ761 pBBR1MCS-2**	**SVQ761 pMUS1306**
0,3 ± 0,5 A	1,3 ± 1,5 A	0,3 ± 0,5 A	1 ± 2 A

Las cifras seguidas de una misma letra, dentro de cada columna, no difieren significativamente al nivel del 5%.

Tabla 39. Número de nódulos por planta de *M. sativa* formados por las estirpes SVQ747 y SVQ761, SVQ761 pBBR1MCS-2 y SVQ761 pMUS1306 pasados 17 días de la inoculación.

Número de nódulos por planta 17 dpi			
SVQ747	**SVQ761**	**SVQ761 pBBR1MCS-2**	**SVQ761 pMUS1306**
2,8 ± 2,8 A	6 ± 3,5 A	2,3 ± 1,9 A	4,3 ± 3,6 A

Las cifras seguidas de una misma letra, dentro de cada columna, no difieren significativamente al nivel del 5%.

8.3.4 Estudios de adhesión - colonización a las raíces de alfalfa por E. meliloti SVQ747 y su derivado mutado en el gen nolG, SVQ761

La capacidad colonizadora de la bacteria en los primeros días tras la inoculación puede ser clave para que una estirpe sea más competitiva, por ello se han realizado experimentos de adhesión colonización de las raíces de la alfalfa a las 2, 24, 48 y 72 horas tras la inoculación de la estirpe parental SVQ747 y SVQ761, haciendo una rotura mecánica de la raíz para separar a las bacterias íntimamente adheridas. Los resultados mostraron que el mutante por deleción, SVQ761, mostró prácticamente el doble de bacterias adheridas que el parental a las 24 y 48 horas, igualándose el número a las 72 horas (Tabla 40).

Tabla 40. Número de bacterias por gramo de peso fresco de raíz. Resultados obtenidos rompiendo mecánicamente las raíces para separar las bacterias adheridas.

ESTIRPE	**2 hpi (ufc/gpfr)**	**24 hpi (ufc/gpfr)**	**48 hpi (ufc/gpfr)**	**72 hpi (ufc/gpfr)**
SVQ747	$3,9 \times 10^3$	$5,9 \times 10^3$	$6,9 \times 10^3$	1×10^4
SVQ761	$6,9 \times 10^3$	$9,9 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$

Este experimento se realizó siguiendo otra metodología, en la que las raíces de *M. sativa* fueron sometidas a sonicación en un baño de ultrasonidos a las 2, 24, 48 y 72 horas después de la inoculación con SVQ747 y SVQ761 para de esta forma separar a las bacterias que estaban unidas a la superficie de la raíz. Los resultaron mostraron

igualmente que a las 24 horas el número de bacterias de la estirpe mutante adheridas fue el doble que el de la bacteria parental. A las 48 horas se encontró que había un orden de magnitud más bacterias adheridas a la superficie de la raíz de la estirpe mutante que de la cepa silvestre. Sin embargo, a las 72 horas esas diferencias se hicieron menores, (Tabla 41).

Tabla 41. Número de bacterias por gramo de peso fresco de raíz. Resultados obtenidos sonicando las raíces para separar las bacterias adheridas.

ESTIRPE	2 hpi (ufc/gpfr)	24 hpi (ufc/gpfr)	48 hpi (ufc/gpfr)	72 hpi (ufc/gpfr)
SVQ747	$2{,}32 \times 10^3$	$7{,}62 \times 10^4$	$1{,}52 \times 10^5$	$8{,}20 \times 10^5$
SVQ761	$1{,}86 \times 10^3$	$1{,}83 \times 10^5$	$1{,}57 \times 10^6$	$1{,}07 \times 10^6$

No se ha podido hacer comparación estadística de ambos experimentos juntos puesto que por metodología no son comparables, pero en ambos se encontraron diferencias en la colonización de SVQ761 frente a SVQ747 a las 24 y 48 horas.

9. Expresión del promotor del gen *nodC* en presencia de luteolina

Conocido el sistema de retroalimentación negativo que existe en *Bradyrhizobium japonicum*, por el cual la presencia de factores de nodulación en el interior celular reprime la expresión de genes *nod* (Loh y Stacey, 2001), así como lo que ocurre en *E. meliloti* GR4, donde la expresión de los genes *nod* se ve reprimida tanto en un mutante en el gen *nodC*, como en un mutante en el gen *tepI* (transmembrane efflux protein), (van Dillewijn *et al*., 2009), se ha estudiado y comparado la expresion de los genes *nod* en la estirpe silvestre y en los dos mutantes del gen *nolG*, mediante la transferencia por conjugación en las tres bacterias del plásmido pRmM57 (*nodC*::*lacZ*) y el estudio comparado de sus actividades β-galactosidasa inducidos con luteolina y en situación control.

En la Figura 67 se muestran los resultados, en los que no se apreciaron diferencias en la expresión de los genes *nod* en ninguno de los mutantes en comparación con la cepa parental.

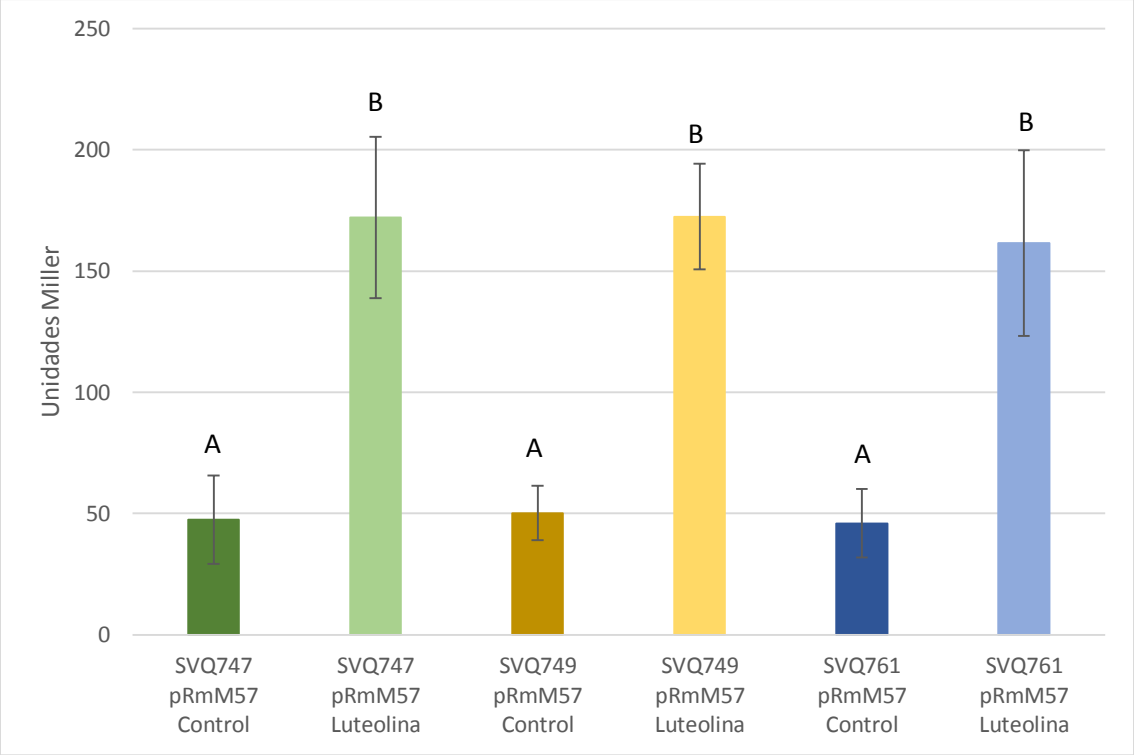


Figura 67. Actividad β-galatosidasa, expresada en Unidades Miller, de SVQ747, SVQ749 y SVQ761 con el plásmido pRmM57 en presencia y ausencia de luteolina (1 µg ml^{-1}). Las columnas con una misma letra no difieren significativamente al nivel del 5%.

No se ha encontrado la posible función en la tolerancia a metales pesados del gen *nolG* en *E. meliloti* SVQ747, así como tampoco frente a otros compuestos antimicrobianos. Sin embargo, parece ser que dicho gen posee una función en simbiosis. Es posible que al estar mutado en el componente de membrana interna del sistema RND la estirpe pase a ser más competitiva por la nodulación de *M. sativa* que la estirpe parental y colonice mejor las raíces de dicha planta.

En *E. medicae* SVQ748 la función de dicho gen parece ser diferente a la mostrada en *E. meliloti* SVQ747, ya que la estirpe SVQ750 mostró una tendencia a una menor tolerancia a cinc y cadmio y no se observaron diferencias simbióticas en competitividad de la estirpe mutante respecto del parental SVQ748.

DISCUSIÓN

Debido a la necesidad de reducir la adición de los fertilizantes nitrogenados a los suelos, los rizobios han ido ganando un gran valor agrícola y juegan un papel importante al aportar fertilidad al suelo (Zahran, 1999). Sin embargo, la presencia de estirpes de rizobios autóctonas en los suelos, normalmente altamente competitivas y bien adaptadas a esos ambientes, puede reducir los beneficios de la inoculación incluso frente a estirpes altamente eficientes. Sin embargo, especialmente en suelos de regiones áridas o semiáridas, la supervivencia y el funcionamiento efectivo de las poblaciones tanto naturales como inoculadas se puede ver reducido por las altas temperaturas del suelo, la sal, el estrés osmótico, la acidez, la alcalinidad y la presencia de metales pesados (Zahran, 1999). Problemas de estos tipos son los encontrados en los suelos de las áreas de estudio, Marismas del Odiel y Río Tinto, donde se detectaron salinidad, alcalinidad, acidez y contaminación por metales pesados, problemas que, además, pueden presentarse solos o en combinación, (Tablas 6 y 9).

La acidez (pH<5) o alcalinidad (pH>8,5) y el bajo contenido en arcillas se consideran estreses abióticos primarios y factores importantes para tener en cuenta tanto el número de bacterias (Fierer y Jackson, 2006), como los rizobios especialmente infectivos (Cheminig'wa y Vessey, 2006) y su diversidad (Giongo *et al.*, 2008). En los suelos objeto de estudio se encontraron bajos niveles de arcilla sólo en las zonas del "Arenal Seco" y del "Arenal Inundado" que, además, presentaban pH alcalino, lo que los hace suelos con un nivel de estrés abiótico a tener en cuenta. Sin embargo, los otros tres suelos analizados en esta zona, presentaron textura arcillosa y pH ácido o alcalino dependiendo de la zona, (Tablas 6 y 7). Hay estudios en los que se ha visto que el menor número de estirpes de rizobios y también el menor número de nódulos por planta proviene de suelos ácidos (Herridge *et al.*, 2008; Kuykendall, 2005). Sin embargo, en este trabajo se han aislado 15 estirpes de la zona de suelo ácido "Minas de Río Tinto", únicamente 10 de la zona "Recuperada" y 17 del "Arenal Seco". A pesar de que los rizobios aislados de suelos ácidos no tienen por qué crecer bien en medio ácido, un rizobio que crezca bien en medio de cultivo ácido se considera una característica positiva cuando se seleccionan riobios para elaborar inoculantes para suelos ácidos (Howieson y Ewin, 1986; Glenn y Dilworth, 1994). Entre los aislamientos, no se han obtenido rizobios que destaquen por su tolerancia a pH realmente ácidos, puesto que ninguno de los aislamientos creció a pH 5 en el medio de cultivo tamponado y solamente algunos de ellos lo hicieron a pH 5,5. En concreto, son los aislamientos de nódulos de *M. marina* y de *Trifolium* sp. los que

toleraron pH 5,5 sin dificultad (Tabla 15), por lo que teniendo en cuenta la afirmación de Howieson y Ewin (1986) y de Glenn y Dilworth (1994), estos serían los aislamientos a utilizar para su aplicación a suelos ácidos en el futuro.

Por otro lado, la salinización del suelo ha sido un problema en la agricultura desde hace cientos de años; actualmente está causando problemas en muchas partes del mundo, especialmente en regiones áridas y semiáridas (Manchanda y Garg, 2008) y se predice que este problema empeore bajo la influencia del cambio climático con el aumento de las condiciones climáticas extremas y la elevación del nivel del mar (Rozema y Flowers, 2008). El efecto negativo de la salinidad en el crecimiento y el desarrollo de las plantas es un problema considerable para la agricultura y la producción mundial de alimentos. En el mundo, más del 20% de la superficie agrícola está afectada por la salinidad y su origen puede ser natural o antropogénico. Un suelo se considera salino si la conductividad eléctrica de la pasta saturada (equivalente a la sal disponible en el agua de los poros del suelo) está alrededor de 4 mS/cm, equivalente a ≈ 40 mM de NaCl, que es igualmente equivalente al 7% de la salinidad del agua del mar, (Bruning y Rozema, 2013).

Los valores de conductividad de los suelos estudiados no fueron tan altos, situándose la mayor concentración en 2,60 mS/cm en la zona "No Recuperada". Los valores de contenido en sal del resto de zonas muestreadas se han situado por debajo de este valor, por lo que no serían considerados suelos especialmente salinos. Sin embargo, los rizobios aislados de algunos de ellos sí que presentaron tolerancia a altas concentraciones de NaCl en el medio de cultivo, lo que concuerda con los resultados de Zahran, (1999) que concluye que las estirpes tolerantes a la sal, no tienen por qué provenir necesariamente de suelos salinos y viceversa. Ibragimova *et al*. (2006) tampoco encontraron correlación aparente entre la tolerancia a la sal y el sitio de origen o las especies de plantas noduladas en una amplia colección de estirpes de *Ensifer* de una región contaminada por salinidad en el Mar de Aral. Esto es lo que se muestra en esta Tesis, donde podemos observar que los aislamientos de las distintas especies de *Medicago* toleraron en su mayoría concentraciones de 450 mM de NaCl y, en el caso de los aislamientos de *M. marina,* concentraciones de hasta 800 mM; sin embargo, esta especie ha sido muestreada de zonas consideradas no salinas, como lo fueron tanto el "Arenal seco" de Marismas del Odiel como las dunas de la playa de San Fernando. Guefrachi *et al*. (2013) encontraron

resultados similares en otros aislamientos de *M. marina*, ya que la mayor parte de ellos fueron capaces de crecer en presencia del 5% (862 mM) de NaCl, y cinco cepas toleraron únicamente el 3% (517 mM) y el 4% (589 mM) en medio YM.

Los contaminantes inorgánicos, en particular metales y metaloides, no se pueden degradar biológicamente y son básicamente indestructibles y difíciles de eliminar de los suelos contaminados, amenazando la biodiversidad de microorganismos nativos y la producción de los cultivos, ya que afectan negativamente al metabolismo de la planta y reducen la producción, así como la calidad de los alimentos (Ferraz *et al.*, 2012). En este contexto, las leguminosas son un componente importante de los ecosistemas agrícolas, ya que juegan un papel fundamental en la cadena alimentaria animal y en el consumo humano, manteniendo la fertilidad del suelo, así como el reciclado biogeoquímico de los metales de los suelos contaminados (Xie *et al.*, 2015). La posible amenaza de la contaminación por metales pesados para la salud pública y la vida silvestre ha llevado a la preocupación por el desarrollo de sistemas hechos por el hombre que puedan eliminar o neutralizar los efectos adversos (Kamran *et al.*, 2013). El uso de plantas acumuladoras de metales, crecidas en condiciones de cultivo intensivo, es una posible vía para eliminar diferentes metales del suelo. Además, este sistema es poco costoso y una fuente segura de remediación (Lasat, 2002), pudiéndose usar para eliminar la contaminación del suelo y del agua y también para prevenir futuras contaminaciones de forma efectiva (Zhang *et al.*, 2011). Sin embargo, hay muchas características restrictivas en relación con la fitorremediación, como la lentitud del crecimiento y la poca biomasa que desarrollan las plantas en suelos contaminados por metales (Li y Ramakrishna, 2011).

Muchos estudios han demostrado que los microorganismos ayudan a la fitorremediación mejorando la producción de biomasa y la absorción de metales por las plantas (Farrag *et al.*, 2012; Langella *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2011, Ma *et al.*, 2011; Rajkumar *et al.*, 2010; Whiting *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha prestado poca atención a potenciar los microorganismos endófitos aislados de especies de cultivo que crecen en zonas contaminadas con metales pesados.

En los suelos analizados en este trabajo se ha detectado la presencia de metales pesados, a veces en concentraciones preocupantes tratándose de ecosistemas protegidos, como es el caso del cobre y del arsénico (Tabla 11). Pero gran parte de las bacterias aisladas de ellos presentaron resistencia a metales pesados, lo que como se ha dicho, puede ser una

fuente de microorganismos beneficiosos que ayuden a las plantas a mejorar las condiciones del suelo. Los metales a los que se ha observado una mayor resistencia entre los aislamientos de todas las zonas han sido arsénico y cobre (Tabla 22), precisamente aquéllos que se encuentran en concentraciones más preocupantes. Cabe mencionar que muchos de estos aislamientos también presentaban tolerancias destacables a cobalto, níquel y cinc. Los estudios de tolerancia a cadmio realizados a los aislamientos de *M. marina*, indicaron que todos los aislamientos toleraron concentraciones de cadmio por debajo de 0,5 mM, que es aquella a partir de la cual un microorganismo se considera tolerante. En el caso del cinc, las bacterias resultaron más tolerantes, puesto que todas ellas fueron capaces de crecer como mínimo con 1 mM, concentración a la que una bacteria ya se considera tolerante (Tabla 23).

Se ha publicado que las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) presentan funciones enzimáticas útiles para mejorar el crecimiento de las plantas en condiciones de estrés. En principio, muchas de ellas se desarrollan en la superficie de la raíz y en los alrededores del suelo, teniendo la ventaja de la fuente de carbono y energía que suponen los exudados de la raíz (Doornbos *et al*., 2012). Pero también ejercen efectos beneficiosos en sus hospedadores por numerosos mecanismos que promueven el crecimiento de la planta, entre ellos la fijación de nitrógeno, la solubilización de fósforo inorgánico, la producción de fitohormonas y sideróforos, la excreción de diversos compuestos con función antibiótica o la actividad lítica contra los organismos patógenos, etc. (Dobbelaere *et al*., 2003; Pérez-Montaño *et al* 2014). Los efectos de las PGPR provienen de una manipulación compleja del equilibro de la red de hormonas de la planta, implicadas directamente en el crecimiento o la estimulación de la formación de la raíz. Por ejemplo, la biosíntesis de AIA por bacterias PGPR mejora la proliferación de la raíz (Dobbelaere *et al*., 1999; Khalid *et al*., 2004). Las bacterias usan estas fitohormonas para interaccionar con las plantas como parte de su estrategia de colonización, incluyendo la fitoestimulación y la evasión de los mecanismos basales de defensa de la planta.

Los aislamientos de las Marismas del Odiel y Río Tinto han demostrado ser muy variables en cuanto a la capacidad productora de AIA (Tabla 16), ya que los provenientes de la zona "Recuperada" no son especialmente productores, a diferencia de los aislamientos de la especies de *Medicago* del "Arenal Seco" y los de "Minas de Río Tinto" que sí han demostrado ser grandes productores, lo que puede tener ventajas no sólo para la plantas a las que están asociados sino para la propia bacteria, ya que se ha indicado

que el AIA puede también ser una señal molecular bacteriana y puede tener un efecto directo sobre la fisiología de la bacteria (Spaepen *et al*., 2007).

El fósforo es el segundo macroelemento limitante para el crecimiento de las plantas después del nitrógeno (Sharma *et al*., 2013) debido a que su disponibilidad para la planta está, a veces, limitada por su naturaleza compleja, que lo hace difícil de solubilizar al estar formando parte de minerales accesorios como el calcio, el aluminio y el hierro (Narsian *et al*., 2010; Goldstein, 1986).

Bacterias como *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* o *Serratia*, se conocen como bacterias solubilizadoras de fosfato (Sudhakar *et al*., 2000; Mehnaz y Lazarovits, 2006) y lo solubilizan por secreción de ácidos orgánicos que lo hacen disponible para la planta y ayudan a promover su crecimiento (Rodríguez y Fraga, 1999; Khan *et al*., 2009). La secreción de ácidos orgánicos como el glucónico o el cetoglucónico reduce el pH del medio y quela el catión metal del fosfato insoluble (Khan *et al*., 2009). Así, las cinéticas típicas de la solubilización de los fosfatos incluyen una disminución gradual del pH a medida que se aumentan los fosfatos solubles con el tiempo. Los resultados obtenidos en este trabajo prueban una vez más la capacidad solubilizadora de fosfato de los rizobios, ya que se han encontrado estirpes con gran capacidad solubilizadora aisladas de todas las plantas muestreadas, ya sean aislamientos de crecimiento lento de *O. compressus* o cepas de crecimiento rápido aisladas de *Medicago* o *Trifolium*. Aunque hay que destacar que no ha sido ésta una característica generalizada entre todos los aislamientos puesto que se han encontrado aislamientos de las mismas plantas y las mismas zonas que no han presentado dicha capacidad (Tabla 16).

La tolerancia a estreses ambientales en general, como la salinidad, el estrés osmótico, la toxicidad por metales pesados o el bajo pH es un proceso complejo en el que están implicados muchos genes presentes en el cromosoma y en los plásmidos (Delorme *et al*., 2003, Nogales *et al*., 2002) y los ambientes estresados podrían entonces favorecer el intercambio la adquisición y modificación de estos genes favoreciendo procesos de recombinación genética como la conjugación o la transducción y transformación que permiten la transferencia de genes entre los rizobios y resultan en un aumento de la tolerancia al estrés (Elboutahiri *et al*., 2010).

En este trabajo se han aislado rizobios tolerantes y sensibles al estrés, de suelos afectados por salinidad, pH y altos niveles de metales pesados. Ambos tipos de cepas, sensibles y resistentes, se podrían haber mantenido en los cultivares locales de leguminosas,

aportando éstas a los rizobios nichos protectores, como se ha publicado en otras ocasiones (Delorme *et al*., 2003; Fall *et al*., 2008) de este modo, se contribuye a aumentar la diversidad de genotipo y fenotipo. Los rizobios que sobreviven en cada micronicho, están más protegidos por su capacidad de invadir las raíces y formar relaciones simbióticas con las plantas.

No sólo la presencia de diferentes tipos de estrés abiótico en el medio favorece la transferencia génica, sino que el paso horizontal de genes de unas estirpes a otras es de sobra conocido. Algo así es lo que ocurre con los genes de nodulación, que al encontrarse en plásmidos o islas simbióticas se facilita su transferencia y por eso no es suficiente con hacer estudios filogenéticos de genes como el ARNr 16S o los genes *housekeeping* cuando se trata de estirpes de rizobio, sino que hay que tener en cuenta los genes de nodulación. Esta premisa es la que se ha tenido en cuenta en este trabajo para el estudio de los simbiontes de *M. marina*, ya que se ha secuenciado el gen ARNr 16S de 30 aislamientos diferentes de la planta tras eliminar la redundancia de los 80 aislamiento iniciales mediante la técnica de ERIC-PCR. Esta técnica se escogió porque tanto la BOX-PCR, como la ERIC-PCR son muy útiles para la identificación y clasificación de cepas bacterianas, incluyendo *Ensifer* (De Bruijn, 1992). La secuenciación del ARNr 16S de los 30 aislamientos mostró que 29 de ellos presentaban una alta similitud (99 – 100%) con *E. meliloti* LMG 6133^T y solamente una cepa, SF3.41, estaba relacionada con la cepa tipo de *E. medicae* LMG 19920^T (Tabla 17 y Figura 19). No es la primera vez que algo así ocurre ya que otros autores han publicado resultados similares con los aislamientos de otras especies de *Medicago*, en los que la mayor parte de los aislamientos pertenecen a *E. meliloti* y una mínima parte están íntimamente relacionados con *E. medicae*. Talebi *et al*. (2008) publicaron que *E. meliloti* es el principal simbionte de alfalfa en Irán, pero que *E. medicae* no está ausente en aquella región, al igual que Silva *et al*. (2007), que encontraron solamente 6 estirpes de *E. medicae* de 176 aislamientos de *M. sativa*, *Medicago lupulina* y *M. polymorpha* muestreadas en 15 localizaciones en Méjico y que Zribi *et al*. (2004), que identifico únicamente 27 cepas de *E. medicae* en 299 aislamientos de *M. truncatula* en suelos de Túnez, lo que sugiere que *E. meliloti* es el simbionte predominante nodulando los medicagos perennes como *M. sativa* (Talebi *et al*., 2008) o *M. marina*.

Además de secuenciar el gen ARNr16S de todos los aislamientos, se obtuvo y analizó la secuencia parcial del gen *housekeeping glnII* de una serie de aislamientos representativos. Los resultados indicaron (Tabla 17 y Figura 21) que el aislamiento SF3.41 pertenece a la

especie *E. medicae*, puesto que su similitud en este gen fue del 100% con la cepa tipo de *E. medicae* y en el caso del resto de aislamientos secuenciados todos presentaron una similitud del 99% con *E. meliloti* LMG 6133^T. Por lo que de nuevo se corroboró que todos los aislamientos excepto uno pertenecieron a la especie *E. meliloti.* Zakhia *et al.* (2004) aislaron bacterias fijadoras de nitrógeno de leguminosas de una región del sur de Túnez y cuatro de esos aislamientos (STM 361, STM 362, STM 382 y STM 383) fueron aislados de nódulos de *M. marina*, especie amenazada en aquella área geográfica. Una de las estirpes se identificó como *Rhizobium*, siendo la especie más relacionada *R. galegae* y las otras tres se identificaron como *Ensifer*, con *E. meliloti* como especie más relacionada. Por otro lado, Guefrachi *et al*. (2013) describieron la biodiversidad de los rizobios que nodulan *M. marina* en una región árida de Túnez y todos los aislamientos compartían una similitud del 100% en el gen ARNr 16S (PCR-RFLP) con la cepa de referencia *E. meliloti* ORS 665 (=LMG 6133^T). Por lo que tanto los datos obtenidos en esta Tesis como los de Guefrachi *et al.* (2013) indicarían que las bacterias aisladas de nódulos de *M. marina* pertenecen principalmente al género *Ensifer*, siendo *E. meliloti* la especie más frecuente, no solo en el suroeste de España sino también en el sur de Túnez.

Los aislamientos de *M. marina* presentaron las capacidades de tolerar pH extremos, altas concentraciones de sal e incluso metales pesados (Tablas 19 y 23), pero cabe destacar que, además, todos los aislamientos presentaron un rango de temperatura de crecimiento entre los 22 y los 37 ºC, tolerando 9 de ellos 40 ºC; esta característica ya la había detectado Guefrachi *et al*. (2013) ya que sus aislamientos del sur de Túnez crecieron todos a 40 ºC, lo que concuerda con la observación hecha por Eaglesham y Ayanaba (1984) en rizobios aislados de judía, quienes sugieren que en los aislamientos hechos de zonas cálidas y secas se facilita la selección de rizobios tolerantes a altas temperaturas a partir de las poblaciones naturales.

Los estudios de la resistencia intrínseca a determinados antibióticos (Tabla 19), demostraron que la resistencia a algunos de ellos como la eritromicina y la neomicina varió entre los aislamientos, mientras que todos ellos crecieron en presencia cloranfenicol 60 μg ml^{-1}. La alta resistencia intrínseca de estirpes de *E. meliloti* y *E. medicae* a algunos antibióticos, entre ellos el cloranfenicol, ya se ha descrito anteriormente (Delome *et al*., 2003; Wei *et al*., 2003).

Una vez caracterizados genética y fisiológicamente, se procedió a la caracterización simbiótica de los aislamientos de *M. marina.* Se observó que no todos los aislamientos

presentaron la misma relación simbiótica con las diferentes plantas de *Medicago* testadas (Tabla 20). En *M. sativa* todas las estirpes fueron fijadoras de nitrógeno (Fix+) con la excepción de SF3.48 que indujo nódulos inefectivos. En *M. polymorpha* y *M. murex* la mayoría de los aislamientos indujeron solamente abultamientos en la raíz. En las otras especies de *Medicago*, incluyendo *M. marina*, se observaron más diferencias entre las distintas cepas, mientras que unas formaron nódulos fijadores otras dieron lugar a nódulos inefectivos. Es de interés mencionar que únicamente el aislamiento SF3.41 y la estirpe control *E. medicae* M19.1 formaron nódulos efectivos en todas las especies de *Medicago* testadas. La cepa tipo *E. meliloti* LMG 6133^T dio lugar a nódulos no fijadores en dos plantas, *M. orbicularis* y *M marina,* y a nódulos fijadores en otras dos, *M. sativa* y *M. minima*. Estos resultados mostraron que, aunque la mayoría de los aislamientos están relacionados con *E. meliloti*, no comparten el mismo rango de nodulación ni con la cepa tipo de *E. meliloti* ni con el resto de aislamientos, siendo por tanto simbióticamente diversos.

El comportamiento simbiótico de *E. medicae* LMG 19920^T fue inesperado, esta estirpe o bien no desarrolló nódulos o bien desarrolló pocos y tardíos; esto ocurrió en la mayoría de las plantas, incluida *M. polymorpha*, siendo ésta su especie de referencia para la simbiosis (Rossbach *et al*., 2008).

Desde el punto de vista del hospedador, para conocer el rango de nodulación de *M. marina* se seleccionaron una serie de especies del genero *Ensifer* (*E. americanus* CFNEI 156^T, *E. arboris* LMG 14919^T, *E. fredii* HH103, *E. kostiense* LMG 15613^T, *E. kummerowiae* CCBAU 71714^T, *E. morelense* Lco4^T, *E. saheli* LMG 7837^T, y *E. terangae* LMG 7834^T) y se probó su capacidad para nodular y su eficiencia en plantas de *M. marina* usando *M. sativa* como control. Así es como se observó que la única especie capaz de nodular de forma eficiente *M. marina* entre las probadas fue *E. kummerowiae* CCBAU 1714^T. Las cepas de otras especies solamente llegaron a formar pequeños nódulos blancos, como fueron los casos de *E. kostiensis*, *E. americanus* y *E. terangae*, mientras que el resto de las especies testadas no produjeron nódulos.

De los estudios simbióticos realizados tanto de los aislamientos obtenidos de los nódulos de las plantas de *M. marina* como de los ensayos realizados con las cepas tipo de *Ensifer* sobre esta planta, se puede concluir que los simbiontes naturales más frecuentes de *M. marina* pertenecen a *E. meliloti,* que, por primera vez, se ha aislado una cepa perteneciente

a *E. medicae* de nódulos de esta planta, y que, también por vez primera, se ha demostrado que *E. kummerowiae* nodula eficientemente a *M. marina* bajo condiciones de laboratorio.

El establecimiento de una simbiovariedad requiere conocimientos, entre otras características, de la especificidad simbiótica, que depende mucho de los genes de nodulación. El establecimiento de las simbiovariedades se basó primero en la capacidad para nodular o no en una especie de planta y después se extendió a la capacidad de fijar nitrógeno, (Kim *et al*., 2012; Radeva *et al*., 2001). Para intentar determinar la causa de la gran diversidad encontrada en el comportamiento simbiótico de los aislamientos de *M. marina* en las diferentes especies de *Medicago*, y ante la posibilidad de que se tratara de cepas pertenecientes a diferentes simbiovariedades, se procedió al estudio de dos de los genes simbióticos, *nodC* y *nodA,* los más usados junto *nodB* (Faghire *et al*., 2012) para este tipo de estudios.

nodC es un gen *nod* común que codifica una *N*-acetil glucosamina transferasa implicada en el ensamblaje de los factores Nod, por ello es esencial para la nodulación en la mayoría de los rizobios (Ruíz-Díez *et al*., 2012). Los resultados del análisis de las secuencias del gen *nodC* de los aislamientos de *M. marina* mostraron una gran similitud (99%) con la de la cepa tipo de *E. meliloti*. Además, en el árbol filogenético construido con las secuencias del gen *nodC* (Figura 22) todos los aislamientos excepto SF3.41, se agruparon en la rama superior con *E. meliloti* ATCC9930^T (=LMG 6133^T) y la cepa RP254, pertenecientes ambas a la simbiovariedad meliloti. La estirpe SF3.41 quedó agrupada junto con las estirpes de la especie *E. medicae*, que no pertenecen a ninguna simbiovariedad definida. El resto de simbiovariedades descritas se agruparon en diferentes ramas del árbol y ninguno de los aislamientos está cercano a ellas.

NodA ejerce su función como acil transferasa en la síntesis de factores Nod. Algunas simbiovariedades de *E. meliloti,* como medicaginis y rigiduloides (Gubry-Rangin *et al*., 2013; Villegas *et al*., 2006) se han descrito teniendo en cuenta la secuencia del gen *nodA*; por esta razón se secuenció dicho gen en una serie de aislamientos. El análisis de las secuencias y la filogenia hecha con el gen *nodA* mostraron resultados semejantes a los obtenidos con *nodC*, todos los aislamientos, excepto el descrito como *E. medicae*, se agruparon con las estirpes descritas como *E. meliloti* simbiovariedad meliloti (Figura 23). Por lo que se puede concluir que los aislamientos de *M. marina* obtenidos en este trabajo pertenecen mayoritariamente a *E. meliloti* simbiovariedad meliloti, excepto SF3.41 que pertenece a *E. mediacae*.

Por tanto, para poder justificar el distinto comportamiento simbiótico de estos aislamientos habría que realizar otros estudios como determinar la existencia de sistemas de secreción de proteínas de tipo III o de tipo IV y la secreción los distintos tipos de efectores que afectaran al rango o a la eficiencia de la nodulación en las distintas plantas. O bien sería interesante estudiar la expresión de distintos péptidos NCR en las diferentes especies de *Medicago* utilizadas que provocaran un distinto comportamiento con las diferentes cepas. Maróti *et al*. (2015) para intentar justificar la existencia de un elevado número de péptidos NCR en *M. truncatula* (más de 750), han postulado que podrían tener efectos específicos de estirpe. Esta hipótesis apoyaría el distinto comportamiento simbiótico de los aislamientos de *M. marina* en las diversas especies de *Medicago,* de modo que la presencia de alguno de estos péptidos en determinadas plantas impediría la diferenciación final a bacteroides funcionales en algunos aislamientos frente a otros.

Muchas de las bacterias aisladas de nódulos de leguminosas en este trabajo presentaron valores de tolerancia a ciertos metales pesados que son considerados como valores de resistencias dentro de las bacterias (Nieto *et al*., 1987; Brim et al., 1999) (Tablas 22 y 23). En particular, algunos aislamientos de *M. marina*, como los casos de las estirpes ORT12 y SF3.41 fueron resistentes a metales pesados como cobalto, cobre, níquel y cinc. Por este motivo, se seleccionaron estos aislamientos para determinar la presencia de algunos de los sistemas de destoxificación de metales encontrados en los rizobios. En particular se seleccionaron los genes *cadA* y *nolG* para conocer su distribución entre los aislamientos de *M. Marina.* Ambos genes fueron amplificados en todos los aislamientos de esta planta, pero se seleccionó al gen *nolG* para continuar su estudio por su posible doble papel en la resistencia a metales y en la simbiosis en algunos de estos aislamientos.

Muchos genes presentes en el psymA aportan versatilidad a *E. meliloti* y pueden funcionar para la adaptación a los dos tipos de vida, libre y simbiótico. Entre los genes *nod* y *nol* presentes en este plásmido se encuentra el operón *nodM-nolFG-nodN.* Surin y Downie (1988) encontraron una homología altamente significativa entre el primer gen del operón y el gen *nodM* de *R. leguminosarum* bv. viciae así como entre el último gen y *nodN* de la misma especie. La homología de aminoácidos fue del 82,2% y 75,2% respectivamente, indicando que estos genes están conservados en, al menos, estas dos

especies. Por la homología de su secuencia, los genes *nolF y nolG* se cree que codifican los componentes MFP y RND, respectivamente, de una bomba MDR de tipo RND. Las proteínas RND forman complejos con proteínas de fusión a la membrana, MFP, en el periplasma y con proteínas canales de membrana externa de la superfamilia *TolC* para acomplejar el transporte desde la célula al medio extracelular. Además, la organización en operones de la proteína MFP y la RND sugiere un probable proceso de coevolucion para proteger a la célula de compuestos tóxicos. Estos hallazgos también sugieren que RND, MFP y OMF actúan en conjunción para mediar el transporte a través de ambas membranas de la envoltura celular, como ha sido evidente por experimentos genéticos (Dinh *et al*., 1994). Los sustratos transportados por los sistemas RND son diversos, desde compuestos antimicrobianos, compuestos hidrofóbicos, metales pesados, etc. Pero en el caso del sistema RND formado por los genes *nolFG*, no se conocen con exactitud los sustratos, así como tampoco se conoce su posible implicación en simbiosis, ya que hay bibliografía que muestra indicios de que pudiera ser un sistema de transporte de factores Nod (Saier *et al*., 1994), mientras que otros autores, como Mendoza-Hernández *et al*. (2007), defienden que no hay evidencias experimentales que soporten la propuesta de que la función de *nolG* es un exportador de lipoquitin oligosacáridos, sino que proponen que *nolG* podría estar implicado en la expulsión de antibióticos como las fluoroquinolonas y la novobiocina, o la sal biliar deoxicolato, más que en el proceso simbiótico rizobio-leguminosa.

Al final del operón se encuentra un gen con homología con *nifN*, pero la orientación de éste al revés, indica que *nodN* es el último gen del operón.

La falta de información confirmada y contrastada acerca de la función de los genes *nolFG* del operón *nodM-nolFG-nodN* ha hecho que se considerara de gran interés, tanto por su posible implicación en la resistencia a metales pesados de los aislamientos de *M. marina*, como por la implicación simbiótica que pudiera tener. Para el estudio del gen *nolG* se escogieron dos de los aislamientos de *M. marina* más resistentes a altas concentraciones de metales pesados, como son *E. meliloti* ORT12 y *E. medicae* SF3.41 cuya resistencia era ligeramente menor que la de ORT12, pero se trataba de la única cepa aislada de *M. marina* que no pertenecía a la especie *E. meliloti*, lo que la hizo especialmente interesante.

Tras la amplificación, secuenciación y análisis del gen *nolG* de ORT12 y SF3.41 y su comparación con las respectivas secuencias del *nolG* de *E. meliloti* 1021 y *E. medicae* WSM 419, se detectaron 18 nucleótidos diferentes en la secuencia de la estirpe ORT12 con respecto a Sm1021, que originaron 7 diferencias a nivel de aminoácidos (Figuras 25 y 27). En el caso de *E. medicae* las diferencias fueron menores, habiéndose encontrado únicamente un nucleótido distinto entre la secuencia del gen *nolG* de SF3.41 y la del mismo gen la cepa de referencia, WSM 419. Esa diferencia a nivel de ADN no determinó cambios en la secuencia de aminoácidos, (Figura 26).

En la secuencia de NolG existen dos residuos de aminoácidos, un aspartato en la posición 408 y una lisina en la 940, que están conservados en la familia HAE-RND pero no en la HME-RND (Perrin *et al*., 2010; Tseng *et al*., 1999) y se ha podido comprobar que en esas posiciones la proteína NolG de *E. meliloti* ORT12, no presentó dichos aminoácidos sino una alanina en la posición 408 y una asparragina en la 940, lo que una vez más apoyaría la pertenencia del gen *nolG* de *E. meliloti* SVQ 747 a un sistema HME-RND implicado en el transporte de metales pesados.

Una vez obtenidos los mutantes en el gen *nolG* por inserción del casete *lac*Z-Gm en *E. meliloti* SVQ747 y *E. medicae* SVQ748, derivados espontáneos rifampicina resistentes de ORT12 y SF3.41, respectivamente, se estudió su resistencia a metales pesados. En el caso de *E. meliloti* SVQ747, no se apreciaron diferencias en la tolerancia a cobre, cinc, cadmio, cobalto y níquel entre la estirpe parental SVQ747 y su derivado mutado en el gen *nolG*, SVQ749, por el método de la difusión en discos en las condiciones estudiadas (Tabla 24). Sin embargo, comparando la estirpe parental de *E. medicae*, SVQ748, con la estirpe mutante, SVQ750, se observó una tendencia a una menor tolerancia a cinc y cadmio del mutante. Las pocas diferencias encontradas entre los mutantes en *nolG* y las cepas parentales podrían ser debidas a que *nolG* no tenga actividad destoxificadora de estos metales en estas bacterias, o bien que las concentraciones utilizadas no permitan distinguir entre silvestre y mutante, de modo que habría que hacer un barrido utilizando dosis más altas de metales u otros metales.

Paralelamente, se realizaron curvas de crecimiento en presencia de $CdCl_2$ 0,2 mM para las cepas de *E. meliloti* y 0,075 mM para las estirpes *E. medicae* y de $ZnSO_4$ 0,56 y 0,27 mM para *E. meliloti* y *E. medicae* respectivamente, en las que tampoco se encontraron diferencias apreciables en el tiempo de generación de las estirpes parentales y mutantes *nolG* de ninguna de las dos especies de estudio, (Figuras 33, 34, 35 y 36).

Hay ejemplos de otras bombas RND en las que se describe que tienen un papel en la destoxificacion de sustancias antimicrobianas en *E. meliloti* 1021; tal es el caso de los genes SMc02868-SMc02867, cuya mutación por deleción resultó en una disminución de entre 2 y 64 veces la tolerancia a diversos compuestos incluyendo antibióticos, detergentes, colorantes y sustancias sintetizadas por las plantas. Además, cuando los genes SMc02868-SMc02867 se expresaron en *trans* en un vector bajo la expresión de su propio promotor en la estirpe mutante, la resistencia a estos compuestos se restableció completamente. Estos resultados sugirieron que la bomba tipo RND SMc02868-SMc02867, designada SmeAB, juega un papel importante en la expulsión de sustancias toxicas en *E. meliloti* 1021 (Eda *et al*., 2011). Por este motivo, se ha testado tolerancia a sustancias antimicrobianas, como antibióticos o colorantes de las estirpes parentales y mutantes de ambas especies, sin encontrar tampoco resultados de tolerancia diferenciales entre las estirpes parentales y sus derivados mutantes de ambas especies (M. del Saz, comunicación personal).

El hecho de no observar incrementos en la susceptibilidad a sustancias toxicas en los mutantes en el gen *nolG* en SVQ747 y SVQ748 puede deberse a diversas causas, sin contemplar la opción de que las bombas no sean funcionales. En primer lugar, estas bombas podrían expulsar compuestos que no se han probado en este estudio. Además, podría ser que las bombas se expresaran levemente o no se expresaran en las condiciones testadas, por lo que la mutación habría tenido muy poco efecto en la susceptibilidad a los antimicrobianos (Eda *et al*., 2011). Quizá sería oportuno comprobar el efecto que tienen los metales pesados, sustancias tóxicas, antimicrobianos, etc., en las dos estirpes de cada especie en presencia del flavonoide inductor, ya que se ha comprobado su función como activador de la transcripción del gen *nolG*. La tercera causa, podría ser que estas bombas no estuvieran implicadas en la resistencia a antimicrobianos, sino que podrían jugar otros papeles (Eda *et al*., 2011). Muchos estudios han revelado los papeles fisiológicos de las bombas MDR (Martínez *et al*., 2009; Piddock, 2006), por ejemplo, el operón *MexAB-OprM* de *P. aeruginosa* está implicado en la traslocación de señales de *quorum sensing* (Evans *et al*., 1998; Pearson *et al*., 1999). Si la bomba transporta compuestos no tóxicos que sirven para funciones fisiológicas, su actividad no podría ser detectada en test de sensibilidad a compuestos antimicrobianos, metales pesados, ni otro tipo de sustancias tóxicas.

Recientemente se ha descrito en la bacteria patógena de humanos *Stenotrophomonas maltophilia (*Lin *et al*., 2015), que mutaciones en un sistema RND, en este caso de expresión constitutiva, como es *smeYZ*, puede generar cambios en características relacionadas con la colonización del hospedador, como pueden ser la movilidad de tipo *swimming*, la abundancia de flagelos o la formación de *biofilm*. Concretamente, la mutación de este sistema *smeYZ* afecta negativamente a la movilidad tipo *swimming*, ya que el mutante pierde por completo la capacidad móvil que presenta la estirpe silvestre, lo que se explica por la pérdida total de flagelos en la superficie de la bacteria mutante con respecto a la silvestre.

A pesar de evidencias de este tipo en bacterias patógenas, cuando se estudió como afectaba la mutación por inserción de *lacZ*:Gm en *nolG* a la movilidad tipo *swimming* en SVQ749 y SVQ750 frente a sus respectivos parentales SVQ747 y SVQ748 se observaron diferencias, pero en sentido contrario en cada uno de ellos. Se detectó una ligera pero no siempre significativa mayor movilidad *swimming* en el mutante SVQ749 frente a su estirpe parental SVQ747, (Figuras 38 y 47) y una disminución de la misma que no siempre fue significativa en SVQ750 frente a SVQ748 (Figuras 41 y 48). Además, estas diferencias no se debieron a diferencias de crecimiento en el medio de cultivo utilizado, dado que no se observaron cambios apreciables en la capacidad de crecimiento en medio Brommfield, (Figuras 37 y 40).

Para determinar el papel de *nolG* en estos, no siempre significativos, cambios de movilidad observados en los mutantes, se construyeron los plásmidos pMUS1306 y pMUS1313 que portan una copia del gen *nolG* silvestre de SVQ747 y de SVQ748, respectivamente, bajo la expresión de un promotor constitutivo de pBBR1MCS-2. Los resultados de movilidad de SVQ749 portador del plásmido pMUS1306 frente a SVQ749 portador de pBBR1MCS-2 (Figura 39) mostraron una reducción significativa de la movilidad en SVQ749 pMUS1306 frente a SVQ749 pBBR1-MCS2 algo mayor que el aumento de movilidad mostrado por el mutante frente al parental, posiblemente debida a la expresión constitutiva del gen *nolG.*

Igualmente se ha observado que la estirpe mutante SVQ750 portadora del plásmido pMUS1313 aumentó significativamente su capacidad de movimiento (Figura 42), quizás por la expresión constitutiva de nolG, con respecto a SVQ750 pBBR1MCS-2.

Los resultados obtenidos del estudio de la implicación de la mutación en *nolG* mediante inserción de *lacZ*-Gm en la movilidad de tipo *swimming* en las dos estirpes analizadas no

permiten concluir un efecto claro sobre esta propiedad y, en todo caso, denotaría distinto papel en la movilidad tipo *swimming* en una especie bacteriana frente a la otra.

Como ya se ha comentado anteriormente, según la bibliografía disponible la expresión del operón que se está estudiando se induce en respuesta al flavonoide luteolina. Por ello se consideró oportuno estudiar la capacidad inductora haciendo un barrido con distintos flavonoides, en primer lugar, sobre la expresión del promotor del gen *nodA* de *R. leguminosarum* bv. viciae con el plásmido pMP240, y posteriormente, si estos mismos flavonoides inducían la expresión del gen *nolG* aprovechando la inserción del casete *lacZ*-Gm. La actividad β-galactosidasa medida sobre el plásmido pMP240 puso de manifiesto que la mayor parte de los flavonoides probados no indujeron la expresión de los genes *nod* en ninguna de estas dos cepas y en las condiciones estudiadas (Tabla 25). Únicamente los flavonoides 4-7 dihidroxiflavona, isoliriquitigenina y luteolina presentaron valores de inducción por encima de 1,5 veces la inducción frente al control sin flavonoide en la cepa SVQ747 de *E. meliloti*. Por su parte, la hesperitina fue el único flavonoide con valor de inducción por encima de 1,5 veces sobre el control sin flavonoide en *E. medicae* SVQ748 (Tabla 25). A pesar de estos resultados, en experimentos sucesivos se utilizaron los mismos flavonoides para la cepa de *E. meliloti* que para *E. medicae.*

Los bajos valores de inducción de estos tres flavonoides se redujeron más al cuantificar la actividad β-galactosidasa de la inducción del gen *nolG* en el mutante SVQ749 de *E. meliloti* (Tabla 26). Esto puede deberse a la proximidad entre el gen *lacZ* y el promotor del gen *nodA* de *R. leguminosarum* bv. viciae, en comparación con las 4 kb que separan el promotor *nod* del operón del punto en que está inserto el gen *lacZ* en los mutantes SVQ749 y SVQ750. Sin embargo, en el caso de *E. medicae* SVQ750 (Tabla 26) se mantuvieron (caso de la isoliquiritigenina) o aumentaron levemente (caso de la 4-7 dihidroxiflavona). En cualquier caso, ninguno de los valores de inducción obtenidos son los que cabría esperar para genes de nodulación.

Para estudiar el efecto de los flavonoides inductores sobre la movilidad de tipo *swimming* se decidió usar la luteolina, a pesar de los bajos valores de inducción de las fusiones en pMP240 y sobre la de la mutación, por ser el flavonoide típicamente utilizado en *E. meliloti*. En primer lugar, se hicieron curvas de crecimiento en presencia de luteolina para descartar distinto efecto del flavonoide sobre parentales *E. meliloti* SVQ747 y *E. medicae* SVQ748 y sus respectivos mutantes SVQ749 y SVQ750, no observándose diferencias en ninguna de las cepas (Figuras 43, 44, 45 y 46).

Una vez conocida que la luteolina no afectaba al crecimiento se llevaron a cabo los estudios de la movilidad de tipo *swimming* de todas las cepas. En primer lugar, en el caso de *E. meliloti*, se observó (Figura 47) que la luteolina disminuyó significativamente la movilidad tanto en la cepa parental, SVQ747, como en la mutante, SVQ749, y ese efecto no fue debido al metanol, que, por el contrario, aumentó significativamente la movilidad en las dos cepas. Un efecto similar se ha observado en *E. meliloti* GR4 cuya movilidad en superficie en medio mínimo y agar noble 0,6%, se veía reducida en presencia de luteolina (MJ Soto, comunicación personal). Además, de nuevo se observó como el mutante SVQ749 fue significativamente más móvil que SVQ747 en la condición control, por el contrario, la diferencia observada en presencia de luteolina no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, no se han encontrado posibles explicaciones al incremento de movilidad ejercido por el metanol.

La misma disminución de la movilidad por efecto de la luteolina, aunque menos acusadas y sin diferencias estadísticamente significativas, se ha encontrado en el caso de *E. medicae* (Figura 48). No se observó ningún efecto del metanol sobre la movilidad y, de nuevo se puso de manifiesto la menor capacidad móvil del mutante SVQ750 que el parental SVQ748. El distinto comportamiento que la mutación por inserción del *lacZ*-Gm provocó sobre la movilidad de tipo *swimming* indicaría, a pesar de la similitud entre los genes *nolG* de *E. meliloti* SVQ747 y *E. medicae* SVQ748 (99%) y que el proceso seguido para la construcción de los mutantes fue similar, un distinto papel del sistema RND, o de las sustancias que exporta, en la movilidad de estas bacterias.

El efecto reductor de la movilidad que provoca la luteolina en *E. meliloti* SVQ747podría tener su explicación en la implicación simbiótica de la movilidad, ya que la luteolina actuaría como señal que indicaría a la bacteria la presencia de la planta, por lo que la bacteria disminuría su movilidad e iniciaría los sistemas de colonización, formación de biofilm sobre la raíz, curvatura del pelo radical, etc.

La bomba tipo RND NolFG se piensa que está implicada en nodulación porque la inserción de Tn5 en cualquiera de los genes del operón resultó en un retraso en la nodulación y una reducción del número de nódulos en alfalfa (Baev *et al*., 1991). Por lo que se han caracterizado simbióticamente los mutantes por inserción del casete *lacZ*-Gm, *E. meliloti* SVQ749 y *E. medicae* SVQ750, en plantas de *M. sativa*. En primer lugar, se realizaron ensayos de competitividad enfrentando a SVQ750 frente a SVQ748 pGUS3,

usando como control la coinoculación de SVQ748 junto con SVQ748 pGUS3. Los resultados encontrados (Tabla 27) mostraron que la estirpe *E. medicae* SVQ750 tuvo un comportamiento competitivo similar al de la cepa parental SVQ748, con porcentajes en torno al 37 y 32% de nódulos ocupados, respectivamente. Esta diferencia de aproximadamente el 5% se encuentra dentro de los límites de error del experimento en las condiciones realizadas, que se sitúa entre el 7 y el 9% (error determinado considerando la media de tres experimentos independientes), a pesar de que este experimento se realizó una única vez, la falta de diferencias entre los porcentajes mostrados por la estirpe parental y la mutante hizo que no se continuara estudiando el fenotipo simbiótico de las cepas de *E. medicae*.

Los estudios de competitividad por la nodulación de la alfalfa de *E. meliloti* SVQ747 frente a su mutante SVQ749 mostraron (Tabla 28) la mayor capacidad competitiva del mutante con un 77,2 % de nódulos ocupados. Por lo que, de nuevo, se puso de manifiesto el distinto efecto de la mutación de *nolG* en *E. meliloti* SVQ747 y *E. medicae* SVQ748.

Como complemento al estudio de la competitividad por la nodulación en *E. meliloti* SVQ747 y su mutante, se analizó cómo afectaba a esta capacidad del mutante SVQ749 la presencia de copias silvestres constitutivas del gen *nolG* en el plásmido pMUS1306 frente al parental, usándose como controles la estirpe parental y la mutante ambas con el vector sin *nolG* y el mutante con pMUS1306 (Tabla 28). Los resultados mostraron que la presencia de copias del gen *nolG* hicieron que el mutante SVQ749 pMUS1306 retornara a los valores de competitividad (57,4 %) similares al control SVQ747 pBBR1-MCS2 (47,6 %), no siendo esta menor capacidad competitiva debida a la presencia del vector, puesto que SVQ749 pBBR1-MCS2 mantuvo un porcentaje de ocupación ligeramente superior (89,5 %) al mutante sin plásmido (77,2 %). Estos resultados parecen apoyar la idea de que el fenotipo más competitivo que tiene el mutante SVQ749 se debe a la falta de la proteína NolG funcional, quizás por la imposibilidad de secretar algún compuesto que le haría ser más competitivo por la nodulación que el silvestre.

Otros parámetros simbióticos estudiados fueron la cinética y la eficiencia de nodulación que podrían aportar información muy interesante para aclarar qué está ocurriendo en el mutante SVQ749. Observando la cinética de nodulación (Figura 50), cabe destacar que el mutante SVQ749, además de ser más competitivo que el parental, indujo un mayor número de nódulos por planta que SVQ747 en los primeros días tras la inoculación,

llegando este número a ser significativamente diferente a los 17 días tras la inoculación (Tabla 29).

Igualmente, se realizaron ensayos de cinética de la nodulación en las estirpes portadoras de los plásmidos pBBR1MCS-2 y pMUS1306, (Figura 51) observándose, cómo copias extra de *nolG* en SVQ749 pMUS1306 le hizo disminuir la velocidad de nodulación con respecto al mutante portador del plásmido pBBR1MCS-2, SVQ749 pBBR1MCS-2, pero esta tendencia a disminuir no fue estadísticamente significativa (Tablas 30 y 31).

Los ensayos de eficiencia (Tabla 32) no mostraron diferencias destacables entre las distintas cepas de *E. meliloti*, lo que demostraría que a pesar de que el mutante fue más competitivo por la formación de nódulos, esto no repercutió en su capacidad efectiva.

Otra función que podría estar implicada en el fenotipo simbiótico observado es la capacidad de colonización de las raíces, por lo que se hicieron experimentos de adhesión-colonización de la raíz de *M. sativa* por parte del parental y el mutante en el gen *nolG*. Los ensayos se hicieron recuperando las bacterias adheridas a la raíz a las 2, 24, 48 y 72 horas después de la inoculación y los resultados mostraron una mayor capacidad colonizadora de SVQ749 frente a SVQ747. De modo que a las 24 horas tras la inoculación las raíces de *M. sativa* inoculadas con la estirpe mutante SVQ749 ya presentaban un número de bacterias un orden de magnitud mayor que las raíces inoculadas con la estirpe parental. Esta diferencia se mantuvo a las 48 horas y casi subió un orden de magnitud más a las 72 horas (Tabla 33).

Estos resultados contrastan con lo publicado en cuanto al fenotipo simbiótico en *M. sativa* de mutantes de *E. meliloti* en el gen *nolG*; ya que Baev *et al*. (1991) realizaron mutantes por inserción de Tn5 en todos los genes del operón en *E. meliloti* AK631 y todos los mutantes, incluido el mutante en el gen *nolG*, mostraron retrasos de entre 3 y 9 días en la nodulación, se redujeron significativamente tanto el número de nódulos por planta, como el peso seco de la parte aérea y, por último, estos mutantes se mostraron mucho menos competitivos que la estirpe silvestre. Sin embargo, cuando ese grupo realizó el mismo estudio en plantas de *Melilotus*, no detectaron diferencias entre la estirpe mutada y la silvestre, explicando este hecho, por la existencia de una función específica de hospedador en estos genes. Estos autores descartan que la mutación mediante la inserción de Tn5 esté causando un efecto polar en los genes que se encuentran corriente abajo, porque al generar un mutante en el que Tn5 se sitúa entre los genes *nolF* y *nolG*, dicho mutante no presenta fenotipo simbiótico afectado, como sí ocurre cuando Tn5 se

encuentra interrumpiendo directamente alguno de los genes del operón. En un estudio posterior, Baev *et al*. (1992) afirmaron que las mutaciones inducidas por Tn5 no mostraron un efecto polar en los genes situados corriente abajo del sitio de inserción porque se producía expresión constitutiva de estos genes debido al promotor que hay dentro del trasposón, el cual se ha demostrado que está activo en *E. meliloti* (Rostas *et al*., 1986). Pero no pueden descartar que la expresión constitutiva de estos genes debida al promotor de Tn5 fuera inferior a la de otros genes sobreexpresados (genes *nod* en presencia del flavonoide). Por tanto, no se puede descartar un efecto polar sobre los genes corriente abajo en condición de presencia de flavonoides que contribuya a la ineficiencia de la producción de los factores Nod.

En el año 2011, Eda *et al*. estudiando bombas de tipo RND, construyeron un mutante por deleción sin marcador en el gen *nolG* y no observaron fenotipo simbiótico alterado, por lo que también apoyaron la idea de que el fenotipo simbiótico afectado que describió el grupo de Baev *et al*. (1991), podría deberse al efecto polar ejercido sobre el gen corriente abajo, es decir, sobre el gen *nodN*.

Debido a la escasa inducción de los genes *nod* detectada por experimentos de β-galactosidasa con SVQ747 pMP240 y en el propio mutante SVQ749 con diversos flavonoides (Tabla 26) se estudió la capacidad de inducción de la luteolina mediante ensayos de *q*PCR de la expresión del gen *nodA* de la cepa parental SVQ747. Estos resultados mostraron que la luteolina indujo hasta unas 6 veces al gen *nodA* frente al control sin inducción (Figura 52), y por tanto, debe hacerlo al resto de los genes *nod* en las condiciones en que se ha hecho el estudio (cultivo en medio mínimo a D.O. ~0,3). Sorprendentemente, se encontró el doble de expresión del gen *nodA* en la estirpe mutante SVQ749 con respecto al parental, (Figura 53) lo que podría explicar la mayor capacidad competitiva de este mutante.

Una vez comprobada la inducción de la luteolina sobre la expresión de los genes *nod*, se estudió la expresión de los genes *nolG* y *nodN* en la cepa parental en presencia y ausencia de ésta, observándose que la luteolina indujo 2,5 veces la expresión del gen *nolG* en *E. meliloti* SVQ747, expresión que se considera estadísticamente significativa (Figura 54). De forma similar ocurrió con el gen *nodN* aunque en este caso con una inducción aún más leve (1,4 veces) que la de *nolG*, tan leve que no se considera estadísticamente significativa (Figura 55). La diferencia encontrada entre la expresión de ambos genes se

podría explicar, entre otras razones, porque la transcripción vaya decayendo desde el principio al final del operón; o bien porque al ser el último gen, el ARN se vaya degradando desde los extremos, de forma que el transcrito de *nodN* es el primero en degradarse y por eso la menor la cantidad de ARN que finalmente pasa a ADNc y por tanto la que se detecta mediante *q*PCR.

Finalmente, se ha comparado la expresión del gen *nodN* en la estirpe parental SVQ747 y en la estirpe mutante SVQ749 (Figura 56), observándose una tendencia a una expresión reducida a aproximadamente la mitad, en la estirpe mutante SVQ749 con respeto a la parental SVQ747, por lo que el comportamiento del mutante SVQ749 podría estar influido por esta leve, aunque no significativa, disminución de la expresión.

Para eludir el posible efecto polar sobre *nodN* de la inserción del casete *lacZ*-Gm en el gen *nolG* en el mutante SVQ749, se llevó a cabo la construcción de un mutante en el gen *nolG* por deleción en fase. En el nuevo mutante en el gen *nolG* por deleción, *E. meliloti* SVQ761, se secuenció el fragmento generado para llevar a cabo la mutación y así corroborar que la pauta de lectura del gen *nodN* no se había visto afectada. Posteriormente se siguió el mismo procedimiento de estudio fenotípico que en el mutante SVQ749.

En primer lugar, se estudió el fenotipo en respuesta a cadmio, cinc, cobre, cobalto y níquel y se comprobó que, al igual que en el mutante por inserción del casete *lacZ*-Gm, SVQ749, el mutante por deleción del gen *nolG*, SVQ761, tampoco presentó ningún tipo de alteración en la tolerancia a estos metales pesados (Tabla 34). La observación de la secuencia de aminoácidos de NolG de ORT12 (SVQ747) y de la misma en *E. meliloti* 1021, detectó que la secuencia de la proteína NolG no cumple el patrón de aminoácidos que típicamente tienen las subunidades RND de los sistemas HME-RND1 y HME-RND2 cuyos sustratos son Zn^{2+}, Co^{2+} y Cd^{2+} para el primer tipo y Co^{2+} y Ni^{2+} para el segundo, en ninguna de las dos estirpes. Según Valencia *et al*. (2013), las proteínas de membrana citoplasmática RND tienen 12 alfa hélices transmembrana, entre ellas, la alfa hélice IV contiene dominios de aminoácidos que están conservados en la mayoría de las proteínas RND (Tseng *et al*., 1999). El HME-RND1 y el HME-RND2 tienen los mismos motivos, DFG-DGA-VEN, presentes en las proteínas CzcA (HME1) o CnrA y NccA (HME2) (Nies, 2003; Goldberg *et al*., 1999). Ambos residuos de aspartato y el residuo de glutamato en la alfa hélice transmembrana IV de la proteína CzcA, se requieren para el antiporte protón/sustrato, sugiriendo que probablemente estén implicados en la traslocación del

protón (Nies, 2003; Goldberg *et al*., 1999; Franke *et al*., 2003). La falta de esta secuencia consenso en la secuencia de la proteína NolG de *E. meliloti* SVQ747 podría explicar que no se hayan encontrado diferencias en la capacidad de tolerancia a cadmio, cinc ni cobalto, tanto en el mutante SVQ749 como en el mutante por deleción, SVQ761, dado que estos metales pesados no serían sustrato de la bomba RND que se está estudiando. Las curvas de crecimiento realizadas en presencia de $CdCl_2$ y $ZnSO_4$ tanto en la estirpe parental, como en la cepa mutante y la mutante con copias extra de *nolG* apoyan el resultado anterior, ya que mostraron que las tres cepas presentaron la misma capacidad de crecimiento en presencia de estos metales pesados (Figuras 59 y 60).

Conocido el hecho de que la movilidad *swimming* puede ser uno de los mecanismos que se vea alterado en mutantes en los sistemas RND, se han realizado experimentos de movilidad *swimming* al mutante por deleción del gen *nolG.* Además, se realizaron estudios de las movilidades de las estirpes mutantes portadoras de los plásmidos pBBR1MCS-2 y pMUS1306 en medio Brommfield con kanamicina, para evitar la pérdida del plásmido. En este caso, y al contrario que ocurría con el mutante SVQ749, se ha observado una ligera disminución no significativa de la movilidad del mutante SVQ761 respecto de la cepa parental SVQ747 (Figura 62). Por otra parte, la estirpe SVQ761 portadora del plásmido con copias extra de *nolG* sufrió una reducción significativa de la movilidad, indicando que el posible efecto en movilidad no pudo ser complementado con una mayor dosis génica de *nolG*, sino que la adición de copias extra constitutivas disminuyen aún más la movilidad de tipo *swimming* (Figura 63). Por tanto, mientras que cualquiera de las mutaciones de *nolG* (por inserción o por deleción) no afectaron, en general, de modo significativo a la movilidad tipo *swimming* en *E. meliloti* SVQ747, la presencia de copias extra de *nolG* redujeron significativamente la movilidad de los mutantes en medios con kanamicina.

Por último, se comprobó si el mutante por deleción del gen *nolG*, SVQ761, estaba afectado en su comportamiento simbiótico. Los datos de eficiencia presentados por SVQ761 fueron bastante similares a los de la estirpe parental en todos los parámetros analizados (Tabla 35). Del mismo modo no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de las estirpes portadoras de plásmidos y las cepas parental ni mutante. Por lo que se puede decir que la mutación en el gen *nolG* en la estirpe SVQ747 no afecta a la fijación de nitrógeno, al número de nódulos, ni al peso seco de los mismos en la relación simbiótica con *M. sativa*. Sin embargo, al estudiar la

competitividad por la nodulación, sí que se ha visto que está alterada por la mutación, dado que el mutante por deleción del gen *nolG*, SVQ761, se mostró más competitivo que la estirpe parental (Tabla 36). Lo que ya se había observado en la cepa mutante en el gen *nolG* por la inserción del casete *lacZ*-Gm, aunque en éste último el resultado fue más llamativo que en el mutante delecionado (Tabla 28).

Cuando se estudió la competitividad de la estirpe mutante que porta el plásmido pMUS1306, se observó cómo el fenotipo competitivo recuperó los niveles del parental, lo que, al igual que en el caso del mutante SVQ749, podría explicar la implicación del gen *nolG* en el efecto en competitividad. Sin embargo, cuando se analizaron los datos de competitividad de la estirpe mutante SVQ761 portadora del plásmido pBBR1MCS-2, se apreció una disminución de la competitividad frente al silvestre SVQ747 pGUS3, lo que implicaría algún efecto sobre este fenotipo del plásmido vector, por lo que para el futuro sería conveniente realizar estos experimentos con un plásmido diferente del utilizado y en el que se clonara el gen *nolG* bajo la expresión de su propio promotor *nod*.

La cinética de nodulación que presentó el mutante por deleción SVQ761 fue similar a la mostrada por el mutante SVQ749, pues el número de nódulos por planta en los primeros días también mostró una tendencia a ser mayor al de la estirpe parental, aunque en este caso sin diferencias estadísticamente significativas (Figura 65 y Tabla 37). Sin embargo, las estirpes portadoras del plásmido pBBR1MCS-2 y el que expresa constitutivamente *nolG*, pMUS1306, mostraron un desarrollo de nódulos en los primeros días tras la inoculación disminuido con respecto al mutante SVQ761. Cabe destacar que la presencia del plásmido pBBR1MCS-2 en el mutante SVQ761 muestra una disminución de la velocidad de nodulación mayor que la de la estirpe que porta el plásmido pMUS1306 (Figura 66 y Tablas 38 y 39).

Por último, cuando se realizaron los estudios de adhesión-colonización de SVQ761 en las raíces de *M. sativa* comparándolo con SVQ747, se observaron el doble de unidades formadoras de colonias adheridas del mutante que de la cepa parental SVQ747 a las 24 y 48 horas, igualándose a las 72 horas (Tablas 40 y 41).

Los resultados obtenidos indicarían que los efectos provocados por la mutación en *nolG* en los mutantes SVQ761 y SVQ749 son similares en cuanto al aumento de la capacidad competitiva, la mayor infectividad y la mejora de la adhesión-colonización, siendo más acusados estos efectos en el mutante por inserción de *lacZ*-Gm que en el mutante por deleción. La mayor capacidad competitiva de las estirpes mutantes en el gen *nolG*, podría

estar influida por la mayor capacidad colonizadora que presentan dichas cepas con respecto a la parental SVQ747, lo que además se relaciona con el hecho de que los mutantes desarrollen nódulos antes que el parental. Este efecto presenta una relación directamente proporcional, cuanto mayor es la diferencia de bacterias adheridas, más rápidamente se desarrollan los nódulos y mayor es la capacidad competitiva en comparación con el parental.

Visto todo lo anterior, existía la necesidad de conocer que aspectos podrían estar alterados en las estirpes mutantes que fueran los causantes de la mayor competitividad observada. Por ello se pensó en la posibilidad de que, al estar mutada la bomba RND, se estuvieran acumulando compuestos en el interior celular que estuviesen alterando la expresión de los genes *nod*. Para comprobar esto se transfirió el plásmido pRmM57 a la estirpe parental SVQ747 y las dos cepas mutantes SVQ749 y SVQ761. Este plásmido porta la fusión transcripcional *nodC::lacZ* de modo que se puede ver la expresión de los genes *nod* mediante actividad β-galactosidasa en presencia y ausencia de luteolina. De esta forma se averiguó que la expresión del gen *nodC*, no presentó diferencias de inducción por luteolina entre las tres cepas, al menos en las condiciones estudiadas, medio de cultivo YM a D. O. a 600 nm de ~0,2 - 0,3 (Figura 67). Estos valores fueron ligeramente mayores a los obtenidos con pMP240 pero, sin embargo, no concuerdan con los detectados en la expresión del gen *nodA* entre la estirpe parental y el mutante SVQ749 mediante *q*PCR, siendo, además, la expresión del mutante el doble que la del silvestre (Figura 53). Por tanto, cabe la posibilidad de que la inactividad de la bomba RND esté produciendo la acumulación de algún compuesto que esté sobreexpresando los genes *nod*, pero que esto no sea detectable por experimentos de β-galactosidasa.

En su conjunto, los resultados obtenidos implicarían de alguna manera al sistema RND en la simbiosis de *E. meliloti* SVQ747 con la alfalfa lo que, además, cabría esperar teniendo en cuenta que la expresión de estos genes se induce en respuesta a luteolina. El comportamiento similar, fundamentalmente de mayor competitividad frente al silvestre, observado en los dos mutantes en el gen *nolG,* obtenidos por dos vías distintas, implicaría directamente a este gen con la mejora de esa capacidad. Para explicar que la mutación en *nolG* determine una ganancia de actividad habría que tener en cuenta la mayor expresión de *nodA* en la cepa SVQ749 frente al silvestre, que podría ser indicativa de una mayor producción de factores Nod por el mutante que le diera una ventaja en las

primeras etapas de la simbiosis. La mutación en el gen *nolG*, especialmente en el caso del mutante SVQ749, determinando un sistema RND no funcional, podría provocar que se esté acumulando en el interior celular algún compuesto, como moléculas del tipo acil homoserina lactona (AHL) de cadena larga sugerido por otros autores (Evans *et al*., 1998; Pearson *et al*., 1999; Chan y Chua, 2010) o algún compuesto similar, que necesitaran un sistema RND funcional para su secreción y que, de alguna manera pudieran estar alterando la expresión de genes *nod*, como se ha visto en el caso del gen *nodA* en SVQ749, o bien estar regulando sistemas génicos implicados en la mejor colonización y de esa forma haber provocado una mayor ventaja sobre la cepa parental. En cualquiera de los casos, aún quedaría por determinar el papel exacto del gen *nolG* en el correcto proceso de secreción través del sistema RND y su implicación final sobre la simbiosis o sobre la adaptación al modo de vida libre o al modo simbiótico.

CONCLUSIONES

- El Parque Natural Marismas del Odiel, las dunas de San Fernando y el Paraje Protegido de Río Tinto constituyen áreas de interés para el aislamiento de rizobios tolerantes a distinto tipo de estrés abiótico como salinidad y pH y con propiedades promotoras del crecimiento vegetal como la producción de AIA y solubilización de fosfatos.

- Los rizobios aislados de nódulos *de M. marina* soportan concentraciones de sal superiores a las del resto de aislamientos, crecen en un rango de pH más amplio y presentan propiedades promotoras del crecimiento vegetal de forma más acusada.

- *E. meliloti* simbiovariedad meliloti es el simbionte natural más frecuente de *M. marina* en las zonas estudiadas, además, *E. medicae* ha sido aislado por primera vez de nódulos de esta planta y *E. kummerowiae* ha nodulado eficientemente a *M. marina* bajo condiciones de laboratorio.

- Los aislamientos de *M. marina,* si bien comparten características fisiológicas y filogenéticas, son simbióticamente diversos presentando distinto rango de nodulación entre ellos y con la cepa tipo de *E. meliloti* LMG 6133^{T}.

- El aislamiento *E. medicae* SF3.41, así como la cepa M19.1 fueron las únicas estirpes efectivas en todas las especies de *Medicago* analizadas, lo que no ocurrió con el resto de aislamientos de *M. marina*.

- Los dos mutantes en el gen *nolG* de *E. meliloti* SVQ747 son más competitivos por la nodulación que el silvestre, lo que podría estar relacionado con la mayor capacidad para colonizar las raíces de alfalfa en los primeros días tras la inoculación y con el desarrollo de nódulos tempranos en la planta, siendo estos fenotipos más acusado en el mutante por inserción del casete *lacZ*-Gm que en el mutante por deleción.

- La diferencia en la magnitud del fenotipo simbiótico del mutante SVQ749 con el mutante SVQ761 podría deberse al efecto de la inserción en *nolG* junto a la menor expresión de *nodN* que esta inserción parece provocar.

- El incremento de la expresión del gen *nodA* en el mutante *nolG* por inserción frente al silvestre podría ser debida a la acumulación de algún factor en el interior celular que determinara una mayor síntesis de factores Nod y una mayor capacidad competitiva de este mutante.

- La mutación en el gen *nolG* de *E. meliloti* SVQ747 no afecta a su efectividad simbiótica en *M. Sativa*, así como tampoco afecta de forma significativa a la movilidad de tipo *swimming*.

- El gen *nolG* de *E. meliloti* SVQ747 no parece estar implicado en la tolerancia a los metales pesados ni a diversas sustancias antimicrobianas ensayadas.

- La función del sistema RND al que pertenece NolG, o los sustratos que transporta dicha bomba, parecen ser diferentes en *E. medicae* SVQ748 que en *E. meliloti* SVQ747 ya que se han encontrado ligeras diferencias en su implicación en la tolerancia a metales pesados entre ambas especies, así como distinto fenotipo en competitividad simbiótica.

BIBLIOGRAFÍA

Aarons, S. R. y Graham, P. H. (1991) Response of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* to acidity. *Plant Soil* 134: 145–151.

Abdel-Wahab, H. H. y Zahran, H. H. (1979) Salt tolerance of *Rhizobium* species in broth culture. *Z Allg Mikrobiol* 19: 681–685.

Abdel-Wahab, H. H. y Zahran, H. H. (1983). The effects of water stress on N_2 (C_2H_2)-fixation and growth of *Medicago sativa* L. *Acta Agron Acad Sci Hung* 32: 114–118.

Aiking, H., Kok, K., van Heerikhuizen, H. y van 't Riet, J. (1982) Adaptation to cadmium by *Klebsiella aerogenes* growing in continuous culture proceeds mainly via formation of cadmium sulfide. *Appl Environ Microbiol* 44: 938-944.

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. *Syst Appl. Microbiol* 38 (7): 506-514.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller; W., Myers, E.W. y Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tools. *J Biol Mol* 215: 403-410.

Álvarez-Ortega, C., Olivares, J. y Martínez, J. L. (2013) RND multidrug efflux pumps: what are they good for? *Front Microbiol* 4, 7.

A.M.A (1994) (Agencia de Medio Abiente de Andalucía). Informe Esturión. Preliminary report, vol. 1, p. 300, unpublished.

Amarger, N., Macheret, V. y Laguerre, G. (1997) *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int J Syst Bacteriol* 47: 996–1006.

Andersen, C., Hughes, C. y Koronakis, V. (2001) Protein export and drug efflux through bacterial channel-tunnels. *Curr Opin Cell Bio* 13: 412-416.

Anton. A., Grosse, C., Reissmann, J., Pribyl, T. y Nies, D.H. (1999) CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH34. *J Bacteriol* 181: 6876-81.

Argüello, J., Eren, E. y González-Guerrero, M. (2007) The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. *BioMetals* 20: 233-248.

Argüello, J. M. (2003) Identification of ion-selectivity determinants in heavymetal transport P1B-type ATPases. *J Membr Biol* 195: 93-108.

Atkinson, E. M., Palcic, M. M., Hindsgaul, O. y Long, S.R. (1994) Biosynthesis of *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide Nod factors: NodA is required for an Nacyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8418–22.

Ba, S., Willems, A., de Lajudie, P., Roche, P., Jeder, H., Quatrini, P., Neyra, M., Ferro, M., Prome, J. C., Gillis, M., Boivin-Masson, C. y Lorquin, J. (2002) Symbiotic and taxonomic

diversity of rhizobia isolated from *Acacia tortilis* subsp. Raddiana in Africa. *Syst Appl Microbiol* 25: 130–145.

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. *Mol Gen Genet* 228: 113-124.

Baev, N., Schultze, M., Barlier, I., Ha, D., Virelizier, H., Kondorosi, E. y Kondorosi, A. (1992). Rhizobium *nodM* and *nodN* genes are common *nod* genes: *nodM* encodes functions for efficiency of Nod signal production and bacteroid maturation. *J Bacteriol* 174: 7555–7565.

Bal, N., Mintz, E., Guillain, F. y Catty, P. (2001) A possible regulatory role for the metal-binding domain of CadA, the *Listeria monocytogenes* Cd2þ-ATPase. *FEBS Lett* 506: 249-252.

Barran, L. R., Bromfield, E. S. P. y Brown, D. C. W. (2002) Identification and cloning of the bacterial nodulation specificity gene in the *Sinorhizobium meliloti–Medicago laciniata* symbiosis. *Can J Microbiol* 48: 765–771.

Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. y Turck, M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Path* 45: 493-496.

Bayoumi, H. E. A., Biro, B., Balazsy, S. y Kecskes, M. (1995) Effects of some environmental factors on *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains. *Acta Microbiol Immunol Hung* 42: 61–69.

Bec-Ferté, M. P., Krishnan, H. B., Savagnac, A., Pueppke, S. G. y Promé, J. C. (1996) *Rhizobium fredii* synthesizes an array of lipooligosaccharides, including a novel compound with glucose inserted into the backbone of the molecule. *FEBS Lett* 393: 273–79.

Becker, A. y Pühler, A. (1998) Production of exopolysaccharides. En *The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria*. Spaink, H. P., Kondorosi, A. y Hooykaas, P. J. J. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer pp. 97–118.

Becker, A., Rüberg, S., Küster, H., Roxlau, A. A., Keller, M., Ivashina, T., Cheng, H. P., Walker, G. C. y Pühler, A. (1997) The 32-kilobase exp gene cluster of *Rhizobium meliloti* directing the biosynthesis of galactoglucan: genetic organization and properties of the encoded gene products. *J Bacteriol* 179: 1375–1384.

Becker, A., Schmidt, M., Jager, W. y Puhler, A. (1995) New gentamicin-resistance and *lacZ* promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene* 162: 37-39

Behringer, J.E. (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 84: 188-198.

Bingle, L. E., Bailey, C. M. y Pallen, M. J. (2008) Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr Opin Microbiol* 11: 3–8.

Bladergroen, M. R., Badelt, K. y Spaink, H. P. (2003). Infection-blocking genes of a symbiotic *Rhizobium leguminosarum* strain that are involved in temperature-dependent protein secretion. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 53–64.

Bloss, T., Clemens, S. y Nies, D. H. (2002) Characterisation of the ZAT1p zinc transporter from *Arabidopsis thaliana* in microbial model organisms and reconstituted proteoliposomes. *Planta* 214: 783-791.

Bonaldi, K., Gargani, D., Prin, Y., Fardoux, J., Gully, D., Nouwen, N., Goormachtig, S. y Giraud, E. (2011) Nodulation of *Aeschynomene afraspera* and *A. indica* by photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS285: the nod-dependent versus the nod independent symbiotic interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 24: 1359–1371.

Bordeleau, L. M. y Prevost, D. (1994) Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant Soil* 161: 115–124.

Botsford, J. L. (1990) Analysis of protein expression in response to osmotic stress in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 72: 355–360.

Botsford, J. L. y Lewis, T. A. (1990) Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: production of glutamic acid in response to osmotic stress. *Appl Environ Microbiol* 56: 488–494.

Boulanger, A., Dejean, G., Lautier, M., Glories, M.,Zischek, C.,Arlat, M. y Lauber, E. (2010) Identification and regulation of the N-acetylglucosamine utilization pathway of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. campestris. *J Bacteriol* 192: 1487-97.

Brear, E. M., Day, D. A. y Smith, P. M. (2013) Iron: an essential micronutrient for the legume-*rhizobium* symbiosis. *Front Plant Sci* 4, 359.

Breedveld, M. W., Zevenhuizen, L. P. T. M. y Zehnder, A. J. B. (1991) Osmotically-regulated trehalose accumulation and cyclic beta-(1,2)-glucan excreted by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA-1. *Arch Microbiol* 156: 501–506.

Breedveld, M. W. y Miller, K. J. (1998). Cell-surface β-glucans. En *The Rhizobiaceae*. Spaink, H. P., Kondorosi, A. y Hooykaas, J. J. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 81–96.

Brewin, N. J. (1998) Tissue and cell invasion by *Rhizobium:* the structure and development of infection threads and symbiosomes. En *The Rhizobiaceae*. Spaink, H. P., Kondorosi, A. y Hooykaas, J. J. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 417-429.

Bric, J. M., Bostock, R. M. y Silverstone, S. E. (1991). Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. 535: 538.

Brim, H., Heyndrickx, M., de Vos, P., Wilmotte, A., Springael, D., Schiegel, H.G., Mergeay, M., (1999) Amplified rDNA restriction analysis and further genotypic characterisation of metal resistant soil bacteria and related facultative hydrogenotrophs. *Syst Appl Microbiol* 22: 258-268.

Brockwell, J., Pilka, A. y Holliday, R. A. (1991) Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally-occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils of New South Wales. *Aust J Exp Agric* 31: 211–219.

Brockwell, J., Bottomley, P. J. y Thies, J. E. (1995) Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. *Plant Soil* 174: 143–180.

Broothaerts, W., Mitchell, H. J., Weir, B., Kaines, S., Smith, L. M., Yang, W., Mayer, J. E., Rodríguez, C. R. y Jefferson R. A. (2005) Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* 433: 629–33.

Bruning, B. y Rozema, J. (2013) Symbiotic nitrogen fixation in legumes: perspectives for saline agriculture, *Environmental and Experimental Botany* 92: 134-143.

Camacho, M., Santamaría, C., Temprano, F., Rodríguez-Navarro, D. N., Daza, A., Espuny, R., Bellogín, R. A., Ollero, F. J., Lyra de M. C., Buendía-Clavería, A., Zhou J., Li, F. D., Mateos, C., Velázquez, E., Vinardell, J. M. y Ruiz-Sainz, J. E. (2002) Soils of the chinese hubei province show a very high diversity of Sinorhizobium fredii strains. *System Appl Microbiol* 25: 592–602.

Cardenas, L., Dominquez, J., Santana, J. y Quinto, C. (1996) Role of the *nodI* and *nodJ* genes in the transport of Nod metabolites in *Rhizobium etli. Gene* 173: 183–187.

Carlson, R. W., Forsberg, L. S. y Kannenberg, E. L. (2010) Lipopolysaccharides in *Rhizobium*-Legume Symbioses. En *Endotoxins: Structure, Function and Recognition*, Subcellular Biochemistry 53. Editores: Wang, X. y Quinn, P.J. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. pp 339-386.

Carter, J. M., Gardner, W. K. y Gibson, A. H. (1994) Improved growth and yield of faba beans (*Vicia faba* cv. Fiord) by inoculation with strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae in acid soils in south-west Victoria. *Aust J Agric Res* 45: 613–623.

Cascales, E. y Christie, P. J. (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 1: 137–149.

Cha, C., Gao, P., Chen, Y. C., Shaw, P. D. y Farrand, S. K. (1998) Production of cyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 1119-1129.

Chan, Y. Y. y Chua, K. L. (2010) Growth-related changes in intracellular spermidine and its effect on efflux pump expression and quorum sensing in *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology* 156: 1144–1154.

Cheminig'wa, G. N. y Vessey, J. K. (2006) The abundance and efficacy of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in cultivated soils of the eastern Canadian prairie. *Soil Biol Biochem* 38: 294–302.

Chen, H., Gartner, E. y Rolfe, B. G. (1993) a Involvement of genes on a megaplasmid in the acid-tolerant phenotype of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl Environ Microbiol* 59: 1058–1064.

Chen, H., Richardson, A. E. y Rolfe, B. G. (1993) b Studies on the physiological and genetic basis of acid tolerance in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl Environ Microbiol* 59: 1798–1804.

Chen, H., Gao, K., Kondorosi, E., Kondorosi, A. y Rolfe, B. G. (2005) Functional genomic analysis of global regulator NolR in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant-Microbe Interact* 18: 1340-1352.

Clarke, L. M., Dilworth, M. J. y Glenn, A. R. (1993) Survival of *Rhizobium meliloti* WSM419 in laboratory culture: effect of combined pH shock and carbon. *Soil Biol Biochem* 25: 1289–1291.

Cordovilla, M. P., Ocana, A., Ligero, F. y Lluch, C. (1995) Salinity effects on growth analysis and nutrient composition in four grain legumes-*Rhizobium* symbiosis. *J Plant Nutr* 18: 1595–1609.

Cordovilla, M. P., Ligero, F. y Lluch, C. (1994) The effect of salinity on N fixation and assimilation in *Vicia faba*. *J Exp Bot* 45: 1483–1488.

Correa, O. S. y Barneix, A. J. (1997) Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World J Microbiol Biotechnol* 13: 153–157.

Cough, C. y Cullimore, J. (2011) Lipo-chitoologosaccharide signaling in endosymbiotic plant-microbe interaction. *Molec Pant-Microb Inter* 24: 867-878.

Cren, M., Kondorosi, A. y Kondorosi, E. (1995) NolR controls expression of the *Rhizobium meliloti* nodulation genes involved in the core Nod factor synthesis. *Mol Microbiol* 15: 733-747.

Csonka, L. N. y Hanson, A. D. (1991) Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu Rev Plant Physiol* 45: 569–606.

Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C. y Chen, J. (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 72: 317-64.

Davis, R. A., Welty, A. T., Borrego, J., Morales., Pendon, J.G. 2000. Rio Tinto estuary (Spain): 5000 years of pollution. *Environ. Geol* 39: 1107–1116.

Deakin, W. J. y Broughton, W. J. (2009) Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 7: 312–320.

De Bruijn, F. J. (1992) Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 58: 2180–2187.

De Lajudie, P., Laurent-Fulele, E., Willems,A., Torck, U., Coopman, R., Collin, M. D., Kersters, K., Dreyfuslt, B. y Gillis, M. (1998). *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int J Syst Bacteriol* 48: 1277–90.

De Lyra Mdo, C., López-Baena, F. J., Madinabeitia, N., Vinardell, J. M., Espuny, M del R., Cubo, M. T., Bellogín, R. A., Ruiz-Sainz, J. E. y Ollero, F. J. (2006) Inactivation of the *Sinorhizobium fredii* HH103 *rhcJ* gene abolishes nodulation outer proteins (Nops) secretion and decreases the symbiotic capacity with soybean. *Int Microbiol* 9: 125-133.

Delgado, M. J., Ligero, F. y Lluch, C. (1994) Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants. *Soil Biol Biochem* 26: 371–376.

Delgado, M. J., Garrido, J. M., Ligero, F. y Lluch, C. (1993) Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under sodium chloride stress. *Physiol Plant* 89: 824–829.

Delorme, T. A., Gagliardi, J. V., Angle, J. S., Van Berkum, P. y Chaney, R. L. (2003) Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of clover grown in a Zinc and Cadmium contaminated soil. *Soil Soc Am J* 67: 1746-1754.

De Maagd, R. A, Wijffelman, C. A., Pees, E. y Lugtenberg, B. J. J. (1988) Recognition of individual strains of fast-growing rhizobia by using profiles of membrane proteins and lipopolysaccharides. *Journal of Bacteriology* 170 (8): 3782-3785.

D'Haeze, W. y Holsters, M. (2004) Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity. *Trends in Microbiol* 12: 555-561.

Diels, L., Dong, Q., van der Lelie, D., Baeyens, W. y Mergeay, M. (1995) The czc operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals. *J Ind Microbiol* 14: 142-153.

Dilanji, G. E., Teplitski, M. y Hagen, S. J. (2014) Entropy-driven motility of *Sinorhizobium meliloti* on a semi-solid Surface. *Proc R Soc B* 281: 20132575.

Dinh, T., Paulsen, I. T. y Saier Jr., M. H. (1994) A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 176: 3825–3831.

Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Van de Broek, A. y Van der Leyden, J. (1999) Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil* 212: 155–164.

Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. y Okon, Y. (2003) Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit Rev Plant Sci* 22: 107–149.

Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. y Hacker, J. (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2: 414–424.

Doornbos, R., van Loon, L. yBakker, P. (2012) Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. *A review Agron Sustain Dev* 32: 227–243.

Dover, R. C., Breil, B. T., Triplet, E. W. (1994) DNAsequenceof the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationship with other nodulating bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 7: 564–572.

Downie, J. A. (1998) Functions of rhizobial nodulation genes. En *The Rhizobiaceae*. Spaink, H. P., Kondorosi, A. y Hooykaas, J. J. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 387–402.

Downie, J. A. (2007) Plant science–infectious heresy. *Science* 316: 1296–1297.

Eaglesham, A. R. J. y Ayanaba, A. (1984) Tropical stress ecology of rhizobia, rootnodulation and legume fixation. En *Current developments in biological nitrogen fixation.* Arnold, E. Publishers, London, UKSubba Rao NS, pp 1-35.

Eckhardt, T. (1978) A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1(4): 584-588.

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*. *Appl Environ Microbiol* 77: 2855-2862.

Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, U. y Bottger, E. C. (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene ciding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 17: 7843-7853.

Eitinger, T. y Mandrand-Berthelot, M. A., (2000) Nickel transport systems in microorganisms. *Arch Microbiol* 173: 1-9.

Elboutahiri, N., Thami-Alami, I. y Udupa, S. M. (2010) Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. *BMC Microbiology* 10:15.

El-Sheikh, E. A. E. y Wood, M. (1990) Salt effects on survival and multiplication of chick pea and soybean rhizobia. *Soil Biol Biochem* 22: 343–347.

El-Shinnawi, M. M., El-Saify, N. A. y Waly, T. M. (1989). Influence of the ionic form of mineral salts on growth of faba bean and *Rhizobium leguminosarum*. *World J Microbiol Biotechnol* 5: 247–254.

Embalomatis, A., Papacosta, D. K. y Katinakis, P. (1994) Evaluation of *Rhizobium meliloti* strains isolated from indigenous populations northern Greece. *J Agric Crop Sci* 172: 73–80.

Esseling, J. J., Lhuissier, F. G. P. y Emons, A. M. C. (2003) Nod factor induced root hair curling: continuous polar growth towards the point of nod factor application. *Plant Physiol* 132: 1982–1988.

Estrella, M. J., Muñoz, S., Soto, M. J., Ruiz, O. y Sanjuán, J. (2009) Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating Lotus tenuisin typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Appl Environ Microbiol* 75: 1088–1098.

Evans, J., Hochman, Z., O'Connor, G. E. y Osborne, G. J. (1988) Soil acidity and *Rhizobium*: their effect on nodulation of subterranean clover on the slopes of southern New South Wales. *Aust J Agric Res* 38: 605–618.

Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J. y Poole, K. (1998) Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 180: 5443–5447.

Fagg, C. W. y Stewart, J. L. (1994) The value of *Acacia* and *Prosopis* in arid and semi-arid environments. *J Arid Environ* 27: 3–25.

Faghire, M., Mandri, B., Oufdou, K., Bargaz, A., Ghoulam, C., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E. y Peix, A. (2012) Identification at the species and symbiovar levels of strains nodulating *Phaseolus vulgaris* in saline soils of the Marrakech region (Morocco) and analysis of the *otsA* gene putatively involved in osmotolerance. *Syst Appl Microbiol* 35: 156–164.

Fall, D., Diouf, D., Ourarhi, M., Faye, A., Abdelmounen, H., Neyra, M., Sylla, S. N. y El Idrissi, M. M. (2008) Phenotypic and genotypic characteristics of *Acacia Senegal* (L.) Willd root-nodulating bacteria isolated from soils in the dryland part of Senegal. *Letters in Applied Microbiology* 47: 85-97.

Fan, L. M., Ma, Z. Q., Liang, J. Q., Li, H. F., Wang, E. T. y Wei, G. H. (2011) Characterization of a copper-resistant symbiotic bacterium isolated from *Medicago lupulina* growing in mine tailings. *Bioresour Technol* 102: 703-709.

Farrag, K., Senesi, N., Nigro, F., Petrozza, A., Palma, A., Shaarawi, S. y Brunetti, G. (2012) Growth responses of crop and weed species to heavymetals in pot and field experiments. *Environ Sci Pollut R* 19: 3636–3644.

Fauvart, M. y Michiels, J. (2008) Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium-legume symbiosis. *FEMS Microbiol Lett* 285: 1–9.

Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17: 368–376.

Ferraz, P., Fidalgo, F., Almeida, A. y Teixeira, J. (2012) Phytostabilization of nickel by the zinc and cadmium hyper accumulator *Solanum nigrum* L. Are metallothioneins involved? *Plant Physiol Biochem* 57: 254–260.

Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E. y Gresshoff, P. M.. (2010) Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J Integr Plant Biol* 52: 61–76.

Fernández-López, M., D'Haeze, W., Mergaert, P., Verplancke, C., Promé, J. C., van Montagu, M. y Holster, M. (1996) Role of *nodI* and *nodJ* in lipochitooligosaccharide secretion in *Azorhizobium caulinodans* and *Escherichia coli. Mol Microbiol* 20: 993–1000.

Fierer, N. y Jackson, R. B. (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *PNAS*, 103: 626– 631.

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. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1648-1652.

Finan, T. M. (2002) Evolving insights: symbiosis islands and horizontal gene transfer. *J Bacteriol* 184: 2855–2856.

Finnie, C., Hartley, N. M., Findlay, K. C. y Downie, J. A. (1997) The *Rhizobium leguminosarum prsDE* genes are required for secretion of several proteins, some of which influence nodulation, symbiotic nitrogen fixation and exopolysaccharide modification. *Mol Microbiol* 25: 135–146.

Finnie, C., Zorreguieta, A., Hartley, N. M. y Downie, J. A. (1998) Characterization of *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide glycanases that are secreted via a type I exporter and have a novel heptapeptide repeat motif. *J Bacteriol* 180: 1691–1699.

Franke, S., Grass, G., Rensing, C., Nies, D. H. (2003) Molecular analysis of the coppertransporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185: 3804–3812.

Fujihara, S. y Yoneyama, T. (1993) Effects of pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean rhizobia *Rhizobium fredii* p220 and *Bradyrhizobium japonicum* A 1017. *Appl Environ Microbiol* 59: 1104–1109.

Fujishige, N. A., Lum, M. R., De Hoff, P. L., Whitelegge, J. P., Faull, K. F. y Hirsch, A. M., (2008) Rhizobium common *nod* genes are required for biofilm formation. *Mol Microbiol* 67: 504-515.

Fuqua, W. C., Winans, S. C. y Greenberg, E. P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176: 269-275.

Galdiero, S., Falanga, A., Cantisani, M., Tarallo, R., Della Pepa, M. E., D'Oriano, V. y Galdiero, M. (2012) Microbe-host interactions: structure and role of Gram-negative bacterial porins. *Curr Protein Pept Sci* 13: 843-854.

Galibert, F., Turlough M. F., Long, S. R., Pühler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela,¡ D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R. W., Dréano, S., Federspiel, N. A., Fisher, R. F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernández-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R. W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Kiss, E., Komp, D., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M. C., Pohl, T. M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thébault, P., Vandenbol, M., Vorhölter, F. J., Weidner, S., Wells, D. H., Wong, K., Yeh, K. X., Batut, J.

(2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium* meliloti. Science 293: 668-672.

García-Rodríguez, F. M. y Toro, N. (2000) *Sinorhizobium meliloti nfe* (nodulation formation efficiency) genes exhibit temporal and spatial expression patterns similar to those of genes involved in symbiotic nitrogen fixation. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 583–591.

Gaunt, M. W., Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S. A. y Young, J. P. (2001) Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 2037–2048.

Geiger, O., Glushka, J., Lugtenberg, B. J. J., Spaink, H. P. y Thomas-Oates, J. (1998) Rhizobial *NodFE*-dependent fatty acids which lack an α-β unsaturation are subject to differential transfer leading to novel phospholipids. *Mol Plant-Microbe Interact* 11: 33–44.

Georgiev, G. I. y Atkias, C. A. (1993). Effects of salinity on N2 fixation, nitrogen metabolism and export and diffusive conductance of cowpea root nodules. *Symbiosis* 15: 239–255.

Geremia, R. A., Mergaert, P., Geelen, D., Vanmontagu, M. y Holsters, M. (1994) The NodC Protein of *Azorhizobium caulinodans* is an *N*-acetylglucosaminyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2669–2673.

Geremia, R. A., Mergaert, P., Geelen, D., Vanmontagu, M. y Holsters, M. (1994) The NodC Protein of *Azorhizobium caulinodans* is an *N*-acetylglucosaminyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2669–73.

Giongo, A., Ambrosini, A., Vargas, L. K., Freire, J. R. J. Bodanese-Zanettini, M.H., Passaglia, L. M. P. (2008) Evaluation of genetic diversity of bradyrhizobia strains nodulating soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) isolated from South Brazilian fields. *Appl Soil Ecol* 38: 261–269.

Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, L., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J. C., Jaubert, M., Simon, D., Cartieaux, F., Prin, Y., Bena, G., Hannibal, L., Fardoux, J., Kojadinovic, M.,Vuillet, L., Lajus, A., Cruveiller, S., Rouy, Z., Mangenot, S., Segurens, B., Dossat, C., Franck, W. L., Chang, W. S., Saunders, E., Bruce, D., Richardson, P., Normand, P., Dreyfus, B., Pignol, D., Stacey, G., Emerich, D., Verméglio, A., Médigue, C. y Sadowsky, M. (2007) Legumes Symbioses: Absence of Nod Genes in Photosynthetic Bradyrhizobia. *Science*. 361: 1307-1312.

Glazebrook, J., Ichige, A. y Walker, G. C. (1993) A *Rhizobium meliloti* homolog of the *Escherichia coli* peptide antibiotic transport protein SbmA is essential for bacteroid development. *Genes Dev* 7: 1485–1497.

Glenn, A. R. y Dilworth, M. J. (1994). The life of root nodule bacteria in the acidic underground. *FEMS Microbiol Lett* 123: 1–10.

Goedhart, J., R´ohrig, H., Hink, M. A., van Hoek, A., Visser, A. J., Bisseling, T. y Gadella, T. W. J. (1999) Nod factors integrate spontaneously in biomembranes and transfer rapidly

between membranes and to root hairs, but transbilayer flip-flop does not occur. *Biochemistry* 38: 10898–10907.

Goldberg, M., Pribyl, T., Juhnke, S. y Nies, D. H. (1999) Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the resistance-nodulation-cell división protein family. *J Biol Chem*, 274: 26065–26070.

Goldstein, A. H. (1986) Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *Am J Alternative Agric* 1: 51–57.

Goormachtig, S., Capoen, W. y Holsters, M. (2004) Rhizobium infection: lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes. *Trends Plant Sci* 9: 518–522.

Graham, P. H. (1992) Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can J Microbiol* 38: 475–484.

Graham, P. H., Draeger, K., Ferrey, M. L., Conroy, M. J., Hammer, B. E., Martínez, E., Naarons, S. R. and Quinto, C. (1994) Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Can J Microbiol* 40: 198–207.

Graham, P. H., Viteri, S. E., Mackie, F., Vargas, A. T. y Palacios, A. (1982) Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Res* 5: 121–128.

Grass, G., Fan, B., Rosen, B. P., Franke, S., Nies, D. H. y Rensing, C. (2001) ZitB (YbgR), a member of the cation difusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183: 4664-4667.

Grass, G., Groβe, C. y Nies, D. H. (2000) Regulation of the cnr cobalt/nickel resistance determinant from *Ralstonia* sp. CH34. *J Bacteriol* 182: 1390-1398.

Griffitts, J. S. y Long, S. R. (2008) A symbiotic mutant of *Sinorhizobium meliloti* reveals a novel genetic pathway involving succinoglycan biosynthetic functions. *Mol Microbiol* 67: 1292-1036.

Groβe, C., Anton, A., Hoffmann, T. Franke, S., Schleuder, G. y Nies, D. H. (2004) Identification of a regulatory pathway that controls the heavy-metal resistance system Czc via promoter czcNp in Ralstonia metallidurans. *Arch Microbiol* 182: 109–118.

Groβe, C., Grass, G., Anton, A., Franke, S., Navarrete Santos, A., Lawley, B., Brown, N. L. y Nies, D. H. (1999) Transcriptional organization of the *czc* heavy metal homoeostasis determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 181: 2385-2393.

Gubry-Rangin, C., Béna, C., Cleyet-Marel, J. C., Brunel, B. (2013) Definition and evolution of a new symbiovar, sv. rigiduloides, among *Ensifer meliloti* efficiently nodulating *Medicago* species. *Syst Appl Microbiol* 36: 490– 496.

Guefrachi, I., Rejili, M., Mahdhi, M. y Mars, M. (2013) Assessing genotypic diversity and symbiotic efficiency of five rhizobial legume interactions under cadium stress for soil phytoremediation. *Int J Phytoremediation* 15: 938–951.

Guffanti, A. A., Wei, Y., Rood S. V., Krulwich T. A. (2002) An antiport mechanism for a member of the cation diffusion facilitator family: divalent cations efflux in exchange for K+ and H+. *Molecular Microbiology* 45(1): 145–153.

Gyaneshwar, P., Hirsch, A. M., Moulin, L., Chen, W. M., Elliott, G. N., Bontemps, C., Estrada-de Los Santos, P., Gross, E., Dos Reis, F. B., Sprent, J. I., Young, J. P. y James, E. K. (2011) Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Mol Plant-Microbe Interact*, 24: 1276-1288.

Haag, A. F., Arnold, M. F., Myka, K. K., Kerscher, B., Dall'Angelo, S., Zanda, M., Mergaert, P. y Ferguson, G. P. (2013) Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*-legume symbiosis. *FEMS Microbiol Rev* 37: 364–383.

Haag, A. F., Baloban, M., Sani, M., Kerscher, B., Pierre, O., Farkas, A., Longhi, R., Boncompagni, E., Hérouart, D., Dall'Angelo, S., Kondorosi, E., Zanda, M., Mergaert, P. y Ferguson, G. P. (2011) Protection of Sinorhizobium against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis. *PLoS Biol* 9: e1001169.

Haag, A. F., Kerscher, B., Dall'Angelo, S., Sani, M., Longhi, R. y Baloban, M. (2012) Role of cysteine residues and disulfide bonds in the activity of a legume root nodulespecific, cysteine-rich peptide. *J Biol Chem* 287: 10791–10798.

Hassan, M. T., van der Lelie, D., Springael, D., Römling, U., Ahmed, N. y Mergeay, M. (1999) Identification of a gene cluster, czr, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 238: 417-425.

Hassan, S., y Mathesius, U. (2012) The role of flavonoids in root rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *J Exp Bot* 63: 3429–3444.

Haukka, K., Lindström, K. y Young, J. P. W. (1998) Three phylogenetic groups of nodA and nifH genes in *Ensifer* and *Mesorhizobium* isolated from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Appl Environ Microbiol* 64: 419–426.

Helemish, F. A., Abdel-Wahab, S. M., El-Mokadem, M. T. y Abou-El-Nour, M. M. (1991) Effect of sodium chloride salinity on the growth, survival and tolerance response of some rhizobial strains. *Ain Shams Sci Bull* 28B: 423–440.

Hernandez-Mendoza, A., Quinto, C., Segovia, L. Perez-Rueda, E. (2007) Ligand-binding prediction in the resistance-nodulation-cell division (RND) proteins. *Computational Biology and Chemistry* 31: 115–123.

Herridge, D. F., Peoples, M. B. y Boddey, M. B. (2008) Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* 311: 1–18.

Hickey, E. W. y Hirshfield, I. N. (1990) Low-pH-induced effects on patterns of protein synthesis and on internal pH in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Appl Environ Microbiol* 56: 1038–1045.

Hirsch, A. M. (1992) Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol* 122: 211–237.

Hoelzle, I. y Streeter, J. G. (1990) Increased accumulation of trehalose in rhizobia cultured under 1% oxygen. *Appl Environ Microbiol* 56: 3213–3215.

Howieson, J. G. y Ewing, M. A. (1986) Acid tolerance in the *Rhizobium meliloti* & *Medicago* symbiosis. *Aust J Agr Res* 37: 55–64.

Hubber, A., Vergunst, A. C., Sullivan, J. C., Hooykaas, P. J. y Ronson, C. W. (2004) Symbiotic phenotypes and translocated effector proteins of the *Mesorhizobium loti* strain R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Mol Microbiol* 54: 561-574.

Ibekwe, A. M., Angle, J. S., Chaney, R. L. y Vonberkum, P. (1997) Enumeration and nitrogen fixation potential of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* grown in soil with varying pH values and heavy metal concentrations. *Agric Ecosyst Environ* 61: 103–111.

Ibragimova, M. V., Rumiantseva, M. L., Onishchuk, O. P., Belova, V. S., Kurchak, O. N., Andronov, E. E., Dziubenko, N. I. y Simarov, B. V. (2006) Symbiosis between the nodule bacterium *Sinorhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*) under salinization conditions. *Mikrobiologiia* 75: 94–100.

Ikeda, J. L., Kobaysahi, M. y Takahashi, E. (1992) Salt stress increases the respiratory cost of nitrogen fixation. *Soil Sci Plant Nutr* 38: 51–56.

Imperial, J., Hadi, M. y Amy, N. K. (1998) Molybdate binding by ModA, the periplasmic component of the *Escherichia coli* mod molybdate transport system. *Biochim Biophys Acta* 1370: 337-46.

Jian, W., Susheng, Y. y Jilun, L. (1993) Studies on the salt tolerance of *Rhizobium meliloti*. *Acta Microbiol Sin* 33: 260–267.

Jiménez-Guerrero, I., Pérez-Montaño, P., Monreal, J. A., Preston, G. M., Fones, H., Vioque, B., Ollero, F. J., lopez-Baena, F. J. (2015) The *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *fredii* HH103 Secretion system supresses early defense response to effectively nodulate soybean. *Mol Plant-Microbe Interact* 7: 790-799.

Jiménez-Zurdo, J. I., García-Rodríguez, F. M. y Toro, N. (1997) The *Rhizobium meliloti putA* gene: its role in the establishment of the symbiotic interaction with alfalfa. *Molecular Microbiology* 23 (1): 85-93.

John, M., Röhrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U. y Schell, J. (1993) *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 625–29.

Johnson, J. M. y Church, G. M. (1999) Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps. *J Mol Biol* 287: 695-715.

Jordan, D.C. (1984) Family III. Rhizohiaceae Conn (1938). En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg, N. R., Holt, J. G. vol. 1, Williams & Wilkins, pp 234–254.

Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K. H., Pommerening-Roser, A., Koops, H. P. y Wagner, M. (1998) Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: Nitrosoccocus mobilis and Nitrospira-like bacteria as dominant populations. *Applied and environmental Microbiology* 64: 3042-3051.

Kahn, M. L., McDermott, T. R. y Udvardi, M. K. (1998) Carbon and nitrogen metabolism in rhizobia. En *The Rhizobiaceae*. Spaink, H. P., Kondorosi, A. y Hooykaas, J. J. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 461–485.

Kaijalainen, S. y Lindström, K. (1989) Restriction fragment length polymorphism analysis of *Rhizobium galegae* strains. *J Bacteriol* 171: 5561–5566.

Kambara, K., Ardissone, S., Kobayashi, H., Saad, M. M., Schumpp, O., Broughton, W. J. y Deakin, W. J. (2009) Rhizobia utilize pathogen-like effector proteins during symbiosis. *Mol Microbiol 71*: 92–106.

Kaminski, P. A., Batut, J. y Boistard, P. (1998) A survey of symbiotic nitrogen fixation by rhizobia. En *The Rhizobiaceae*. Spaink, H. P., Kondorosi, A. y Hooykaas, J. J. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 431–60.

Kamst, E., Pilling, J,, Raamsdonk, L. M., Lugtenberg, B. J. J. y Spaink, H. P. (1997) *Rhizobium* nodulation protein NodC is an important determinant of chitin oligosaccharide chain length in Nod factor biosynthesis. *J Bacteriol* 179: 2103–2108.

Kamst, E., Spaink, H. P. y Kafetzopoulos, D. (1998) Biosynthesis and secretion of rhizobial lipochitin-oligosaccharide signal molecules. En *Plant-Microbe Interactions* Biswat y Das. Plenum Press, pp. 29-72.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. y Tabata, S. (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res* 7: 331-338.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M. y Tabata, S. (2002). Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res* 9: 189–197.

Kannenberg, E. L., Reuhs, B. L., Forsberg, L.S. y Carlson, R. W. (1998) Lipopolysaccharides and K-antigens: their structures, biosynthesis, and functions. En *The Rhizobiaceae*. Spaink, H. P., Kondorosi, A. y Hooykaas, J. J. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 120–154.

Kamran, M. A., Mufti, R., Mubariz, N., Syed, J. H., Bano, A., Javed, M. T. y Chaudhary, H. J. (2013) The potential of the flora from different regions of Pakistan in phytoremediation: a review. *Environ Sci Pollut Res* 21: 801–812.

Katznelson, H. y Bose, B. (1959) Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non-rhizosphere soil. *Canadian Journal of Microbiology* 5 (1): 79-85.

Kawaharada, Y., Kelly, S., Wibroe Nielsen, M., Hjuler, C. T., Gysel, K., Muszynki, A., Carlson, R. W., Thygesen, M. B., Sandal, N., Asmussen, M. H., Vinther, M., Andersen, S. U., Krusell, L., Thirup, S., Jensen, K. J., Ronson, C. W., Blaise, M., Radutoiu, S. y Stougaard, J. (2015) Receptor –mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature* 000: 1-5.

Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Micro* 8: 634-644.

Khalid, A., Tahir, S., Arshad, M. y Zahir, Z. A. (2004) Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere and non-rhizosphere soils. *Aust J Soil Res* 42: 921–926.

Khan, A. K., Jilani, G., Akhtar, M. S., Naqvi, S. M. S., Rasheed, M., 2009. Phosphorussolubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in cropproduction. J. Agric. Biol. Sci. 1 (1), 48–58.

Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H.,Park, S. C., Jeon, S. J., Lee,J. H., Yi, H., Won, S. y Chun, S. (2012) Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* 62: 716–721.

Klaassen, C. D., Liu, J. y Choudhuri, (1999) S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 267-294.

Klein, J. S. y Lewinson, O. (2011) Bacterial ATP-driven transporters of transition metals: physiological roles, mechanisms of action, and roles in bacterial virulence. *Metallomics* 3: 1098-108.

Kluge, A. G. y Farris, J. S. (1969) Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst Zool* 18: 1–32.

Kobayashi, H., Sunako, M., Hayashi, M. y Murooka, Y. (2001) DNA synthesis and fragmentation in bacteroids during *Astragalus sinicus* root nodule development. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 510–515.

Kondorosi, E., Gyuris, J., Schmidt, J., John, M., Duda, E., Hoffmann, B., Schell, J., y Kondorosi, A. (1989) Positive and negative control of nod gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 8: 1331-1340.

Kondorosi, E., Mergaert, P. y Kereszt, A. (2013) A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of *Rhizobium* bacteria provoked by host plant factors. *Annu Rev Microbiol* 67: 611–628.

Kondorosi, E., Pierre, M., Cren, M., Haumann, U., Buire, M., Hoffmann, B., Schell, J. y Kondorosi, A. (1991) Identification of NolR, a negative transacting factor controlling the nod regulon in *Rhizobium meliloti*. *J Mol Biol* 222: 885-896.

Köplin, R., Wang, G., Hotte, B., Priefer, U. B. y Pühler, A. (1993) A 3.9-kb DNA region of *Xanthomonas campestris* pv. campestris that is necessary for lipopolysaccharide production encodes a set of enzymes involved in the synthesis of dTDP-rhamnose. *J Bacteriol* 175: 7786-7792.

Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M. y Peterson, K. M (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175-176.

Krause, A., Doerfel, A. y Göttfert, M. (2002) Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 15: 1228-1235.

Krishnan, H. B., Lorio, J., Kim, W. S., Jiang, G., Kim, K. Y., DeBoer, M. y Pueppke, S.G. (2003) Extracellular proteins involved in soybean cultivar specific nodulation are associated with pilus-like appendages and exported by a type III protein secretion system in Sinorhizobium fredii USDA257. *Mol Plant-Microbe Interact* 16: 617-625.

Kuykendall, L. D. (2005) Family I. Rhizobiaceae. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 2, part C. Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., Garrity, G. M. Springer, New York, pp. 324–361.

Laguerre, G., Nour, S. M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P. y Amarger, N. (2001) Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* 147: 981–993.

Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl D. A., Sogin, M. L. y Pace, N. R. (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc of the Nat Acad of sci of the U S A* 82: 6955-6959.

Langella, F., Grawunder, A., Stark, R., Weist, A., Merten, D., Haferburg, G., Büchel, G. y Kothe, E. (2014) Microbially assisted phytoremediation approaches for two multi-element contaminated sites. *Environ Sci Pollut* R21: 6845–6858.

Laranjo, M., Alexandre, A., Rivas, R., Velázquez, E., Young, J. P. y Oliveira, S. (2008) Chickpea rhizobia symbiosis genes are highly conserved across multiple *Mesorhizobium* species. *FEMS Microbiol Ecol* 66: 391–400.

Lasat, M. M. (2002) Phytoextraction of toxic metals. *J Environ Qual* 31: 109–120.

León-Barrios, M., Lorite, M. J., Donate-Correa, J. y Sanjuán, J. (2009) Ensifer meliloti bv. Lancerottense establishes nitrogen-fixing symbiosis with *Lotus* endemic to the Canary Islands and shows distinctive symbiotic genotypes and host range. *Systematic and Applied Microbiology* 32: 413–420.

Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Prome, J. C. y Denarié, J. (1990) Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated oligosaccharide signal. *Nature* 344: 781-784.

LeRudulier, D., y Bernard, T. (1986) Salt tolerance in *Rhizobium*: a possible role for betaines. *FEMS Microbiol Rev* 39: 67–72.

Lesins, K. A., Lesins, I. (1979) Genus *Medicago* (Leguminosae): a taxogenetic study. Dr. W. Junk Publishers The Hague.

Li, K. y Ramakrishna, W. (2011) Effect of multiple metal resistant bacteria from contaminated lake sediments on metal accumulation and plant growth. *J Hazard Mater* 189: 531–539.

Liesegang, H., Lemke, K., Siddiqui, R.A. y Schlegel, H. G. (1993) Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant cnr from pMOL28 of Alcaligenes eutrophus CH34. *J Bacteriol* 175: 767-778.

Lin, Y. T., Huang, Y. W., Chen, S. J., Chang, C. W. y Yang, T. C. (2015) The SmeYZ efflux pump of Stenotrophomonas maltophilia contributes to drug resistance, virulence-related characteristics, and virulence in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 4067–4073

Loh, J. y Stacey, G. (2003) Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: A unique integration of global regulatory circuits. *Appl Environ Microbiol* 69: 10-17.

Long, S. R. (1996) *Rhizobium* symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell* 8: 1885-1898.

Lorquin, J., Lortet, G., Ferro, M., Mear, N., Prome, J. C., Boivin, C. (1997) *Sinorhizobium terangae* bv. acaciae ORS1073 and *Rhizobium* sp. strain ORS1001, two distantly relatedAcacia-nodulating strains, produce similar Nod factors that are O carbamoylated, N methylated, and mainly sulfated. *J Bacteriol* 179: 3079–3083.

Lugtenberg, B. J. J. (1998). Outer membrane proteins. En *The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria*. Spaink, H. P., Kondorosi, A. y Hooykaas, P. J. J. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer pp 45–53.

Luo, S., Chen, L., Chen, J., Xiao, X., Xu, T., Wan, Y., Rao, C., Liu, C., Liu, Y., Lai, C. y Zeng, G. (2011) Analysis and characterization of cultivable heavy metal-resistant bacterial endophytes isolated from Cd hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their potential use for phytoremediation. *Chemosphere* 85: 1130–1138.

Ma, Y., Prasad, M. N. V., Rajkumar, M. y Freitas, H. (2011) Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnol Adv* 29: 248‑258.

Maatallah, J., Berraho, E., Muñoz, S., Sanjuan, J., Lluch, C. (2002) Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. *J Appl Microbiol* 93: 531–540.

Manchanda, G. y Garg, N. (20089 Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiol Plant* 30: 595-618.

Maentsaelae, P. y Zalkin, H. (1984) Glutamine nucleotide sequence of *Saccharomyees eerevisiae* ADE4 encoding phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase. *J Biol Chem* 259: 8478-8484.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A. y Brock, T. (2015) *Brock Biology of Microorganisms*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.

Maiden, M. C. J. (2006) Multilocus sequence typing of Bacteria. *Annu Rev Microbiol* 60: 561–88.

Mana-Capelli, S., Mandal, A.K., Argüello, J. (2003) *Archaeoglobus fulgidus* CopB is a thermophilic Cu2þ-ATPase. *J Biol Chem* 278: 40534-40541.

Mandal, A. K. y Argüello, J. M. (2003) Functional roles of metal binding domains of the *Archaeoglobus fulgidus* Cuþ-ATPase CopA. *Biochemistry* 42: 11040-11047.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, Nueva York (EEUU).

Maróti, G., Downie, J., A. y Kondorosi, E. (2015) Plant cysteine-rich peptides that inhibit pathogen growth and control rhizobial differentiation in legume nodules. *Current Opinion in Plant Biology* 26: 57–63.

Marshall, E., Costa, L. M. y Gutierrez-Marcos, J. (2011) Cysteine rich peptides (CRPs) mediate diverse aspects of cell-cell communication in plant reproduction and development. *J Exp Bot* 62: 1677–1686.

Martínez, J. L. Sánchez, M. B., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A. y Álvarez-Ortega, C. (2009) Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 33: 430–449.

Matamoros, M. A., Dalton, D. A., Ramos, J., Clemente, M. R., Rubio, M. C. y Becana, M. (2003) Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the Rhizobia -legume symbiosis. *Plant Physiol* 133: 499-509.

Maynaud, G., Brunel, B., Mornico, D., Durot, M., Severac, D., Dubois, E., Navarro, E., Cleyet-Marel, J. C., Le Quéré, A. (2013) Genome-wide transcriptional responses of two metal-tolerant symbiotic *Mesorhizobium* isolates to zinc and cadmium exposure. *BMC Genomics* 14, 292.

Maynaud, G., Brunel, B., Yashiro, E., Mergeay, M., Cleyet-Marel, J.C., Le Querré, A. (2014) CadA of Mesorhizobium metallidurans isolated from zinc-rich mining soils is a PIB-2 type ATP involved in cadmium and zinc resistace. *Res Microbiol* 165: 175–189.

Meade, H. M., Long, S. R., Ruvkun, G. B., Brown, S. E. y Ausubel, F. W. (1982) Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* 149: 114–122.

Meade, H. M. y Signer, E. R. (1977) Genetic mapping of *Rhizobium meiloti*. *Proc Natl Acad Sci. USA* 74 (5): 2076-2078.

Mehnaz, S. y Lazarovits, G. (2006) Inoculation effects of *Pseudomonas putida,* Gluconacetobacter azotocaptans, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microb Ecol* 51: 326–35.

Mergaert, P., Nikovics, K., Kelemen, Z., Maunoury, N., Vaubert, D., Kondorosi, A. y Kondorosi, E. (2003) A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol* 132: 161–173.

Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., Mausset, A. E, Barloy-Hubler, F., Galibert, F., Kondorosi, A., Kondorosi, E. (2006) Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium-legume symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 5230–5235.

Mergaert, P., Van Montagu, M. y Holsters, M. (1997) Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Mol Microbiol* 25: 811–817.

Miller, J. H. (1972) En *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, Nueva York (EEUU).

Miller, M. B. y Bassler, B. L., (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55: 165-199.

Miller, R. W., Yu, Z. y Zarkadas, C.G. (1993) The nitrogenase proteins of *Rhizobium meliloti*: purification and properties of the MoFe and Fe components. *Biochim Biophys Acta* 1163: 31-41.

Miller, T. R., Delcher, A. L., Salzberg, S. L., Saunders, E., Detter, J. C y, Halden, R. U. (2010) Genome sequence of the dioxin-mineralizing bacterium *Sphingomonas wittichii* RW1. *J Bacteriol* 192: 6101-6102.

Mishra, R., Singh, R., Jaiswal, H., Kumar, V., Maurya, S. (2006) Rhizobium-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). *Curr Microbiol* 52: 383–389.

Misra, T. K. (1992) Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organo mercurials. *Plasmids* 27: 4-16.

Mnasri, B., Mrabet, M., Laguerre, G., Aouani, M. E. y Mhamdi, R. (2007) Salt tolerant rhizobia isolated from a Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N2-fixation with *Phaseolus vulgaris* constitute a novel biovar (bv. mediterranense) of *Sinorhizobium meliloti*. *Arch Microbiol* 187: 79–85.

Mohammad, R. M., Akhavan-Kharazian, M., Campbell, W. F. y Rumbaugh, M. D. (1991) Identification of salt-and drought-tolerant *Rhizobium meliloti* L. strains. *Plant Soil* 134: 271–276.

Mulrooney, S. B. y Hausinger, R. P. (2003) Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* 27: 239-61.

Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nubel, U., Santegoeds, C., Schafer, H. y Waver, C. (1997) Denaturing grandient gel electrophoresis (DGGE) En *Molecular Microbial Ecology Manual* Akkermans, A. D. L., van Elsas, J. D., de Brujin, F. J. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1-27.

Nakatsukasa, H., Uchiumi, T., Kucho, K., Suzuki, A., Higashi, S. y Abe, M. (2008) Transposon mediation allows a symbiotic plasmid of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii to become a symbiosis island in Agrobacteriumand Rhizobium. *J Gen Appl Microbiol* 54: 107–18.

Narsian, V., Ahmed Abu Samaha, S. M. y Patel, H. H., (2010) Rock phosphate dissolution by specific yeast. *Indian J Microbiol* 50 (1): 57–62.

Navarro, E., Simonet, P., Normand, P. y Bardin, R. (1991) Characterization of natural populations of Nitrobacter spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. *Arch Microbiol* 157: 107-115.

Nelson, M. S. y Sadowsky, M. J. (2015) Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. *Front Plant Sci* 6: 491.

Niehaus, K., Baier, R., Becker, A y, Pühler, A. (1996) Symbiotic suppression of the *Medicago sativa* defense system -the key of *Rhizobium meliloti* to enter the host plant. En *Biology of Plant-Microbe Interactions*. Stacey, G., Mullin, B. y Gresshoff, P. M. ISMPI, St. Paul. pp. 349-352.

Nieto, J., Ventosa, A. y Ruiz-Berraquero, F. (1987) Susceptibility of Halobacteria to Heavy Metals. *Appl Environ Microbiol* 53(5)-1199.

Nies, D. H. (1992) CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc and cadmium (czc system) in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 174: 8102-8110.

Nies, D. H. (1995) The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177: 2707-2712.

Nies, D. H. (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 27: 313–339.

Nies, D. H. (2004) Metals and their compounds in the environment. En *The Elements: Essential and Toxic Effects on Microorganisms*. Anke, K., Ihnat, M. y Stoeppler, M. Wiley-WCH, Weinheim (Part II.1).

Nies, D. H. y Silver, S. (1989) Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 171: 896-900.

Nogales, J., Campos, R., Ben Abdelkhalek, H., Olivares, J., Lluch, C. y Sanjuan, J. (2002) *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 225-232.

Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T. J., Buchanan, S. K. (2010) TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu Rev Microbiol* 64. 43-60.

Nucifora, G., Chu, L., Misra, T. K. y Silver, S. (1989) Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 3544-3548.

O'Hara, G. W. y Glenn, A. R. (1994) The adaptive acid tolerance response in root nodule bacteria and *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* 161: 286–292.

Oldroyd, G. (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature* 11: 252-263.

Olivares, J., Casadesús, J. y Bedmar, E. J. (1980.) Method for testing degree of infectivity of Rhizobium melioti strains. *Appl Environ Microb*. 39: 967-970.

Olsthoorn, M. M. A., López-Lara, I. M., Petersen, B. O., Bock, K., Haverkamp, J., Spaink, H. P. y Thomas-Oates, J. E. (1998). Novel branched Nod factor structure results from α (1–3) fucosyl transferase activity: the major lipochitin oligosaccharides from *Mesorhizobium loti* strain NZP2213 bear and α (1–3) fucosyl substituent on a nonterminal backbone residue. *Biochemistry* 37: 9024–9032.

Oono, R., Schmitt, I., Sprent, J. I. y Denison, R.F. (2010) Multiple evolutionary origins of legume traits leading to extreme rhizobial differentiation. *New Phytol* 187: 508–520.

Paau, A. S., Oro, J., y Cowles, J. R. (1979) DNA content of free living rhizobia and bacteroids of various *Rhizobium* legume associations. *Plant Physiol* 63: 402–405.

Palacios, J. M., Manyani, H., Martínez M, Ureta, A. C., Brito, B., Báscones, E., Rey, L., Imperial, J. y Ruiz-Argüeso, T. (2005) Genetics and biotechnology of the H(2)-uptake [NiFe] hydrogenase from *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae, a legume endosymbiotic bacterium. *Biochem Soc Trans* 33: 94-96.

Parada, M., Vinardell, J. M., Ollero, F. J., Hidalgo, A., Gutiérrez, R., Buendía-Clavería, A. M., Lei, W., Margaret, I., López-Baena, F. J., Gil-Serrano, A. M., Rodríguez-Carvajal, M. A., Moreno, J. y Ruiz-Sainz, J. E. (2006) Sinorhizobium fredii HH103 mutants affected in capsular polysaccharide (KPS) are impaired for nodulation with soybean and cajanus cajan. *MPMI* 19 (1): 43–52.

Patten, C. L.y Glick, B. R. (2002) Role of Pseudomonas putida Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Appl Environm Microbiol* 68: 3795 :3801.

Paulsen, I. T., Park, J. H., Choi, P. S. y Saier, M. H. J. (1997) A family of Gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 156: 1-8.

Paulsen, I. T. y Saier Jr., M. H. (1997) A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J Membr Biol* 156: 99-103.

Pearson, J. P., Van Delden, C. y Iglewski, B. H. (1999) Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* 181: 1203–1210.

Pellock, B. J., Cheng, H. P. y Walker, G. C. (2000) Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *J Bacteriol* 182: 4310–4318.

Penterman, J., Abo, R. P., De Nisco, N. J., Arnold, M. F. F., Longhi, R., Zanda, M., Walker, G. C. (2014) Host plant peptides elicit a transcriptional response to control the *Sinorhizobium meliloti* cell cycle during symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 3561–3566.

Peoples, M. B., Ladha, J. K. y Herridge, D. F. (1995) Enhancing legume N2 fixation through plant and soil management. *Plant Soil* 174: 83–101.

Pérez-Mendoza, D., Sepúlveda, E., Pando, V., Muñoz, S., Nogales, J., Olivares, J., Soto, M. J., Herrera-Cervera, J. A., Romero, D., Brom, S., Sanjuán, J. (2005) Identification of the *rctA* gene, which is required for repression of conjugative transferof rhizobial symbiotic megaplasmids. *J Bacteriol* 187: 7341–7350.

Pérez-Montaño, F., Guasch-Vidal, B., González-Barroso, B., López-Baena, F. J., Cubo, T., Ollero, F. J., Gil-Serrano, A. M., Rodrıíguez-Carvajal, M. A., Bellogín, R. A., Espuny, M. R. (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: 715-723.

Pérez-Montaño, F., Jiménez-Guerrero, I., Contreras Sánchez-Matamoros, S., López-Baena, F. J., Ollero, F. J., Rodríguez-Carvajal, M. A., Bellogín, R. A., Espuny, M. R. (2013) Rice and bean AHL-mimic quorum-sensing signals specifically interfere with the capacity to form biofilms by plant-associated bacteria. *Research in Microbiology* 164: 749-760.

Perret, X., Staehelin, C. y Broughton, W. J. (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 180–201.

Perrin, E., Fondi, M., Papaleo, M. C., Maida, I., Buroni, S., Pasca, R. M., Riccardi, G. y Fani, R. (2010) Exploring the HME and HAE1 efflux systems in the genus *Burkholderia*. *BMC Evol Biol* 10: 164.

Piddock, L. J. (2006) Multidrug-resistance efflux pumps not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* 4: 629–636.

Pinto, F. G. S., Chueire, L. M. O., Vasconcelos, A. T. R., Nicolás, M. F., Almeida, L. G. P., Souza, R. C., Menna, P., Barcellos, F. G., Megías, M. y Hungria, M. (2009) Novel genes related to nodulation, secretion systems, and surface structures revealed by a genome draft of Rhizobium tropici strain PRF 81. *Funct Integr Genomics* 9: 263–270.

Poole, R. K. y Gadd, G. M. (1989) Metals: microbe interactions. *IRL Press, Oxford*, 1-37.

Ponsonnet, C. y Nesme, X. (1994) Identification of *Agrobacterium strains* by PCR-RFLP analysis. *Arch Microbiol* 161: 300-309.

Radeva, G., Jurgens, G., Niemi, M., Nick, G., Suominen, L., Lindstrom, K. (2001) Description of two biovars in the *Rhizobium galegae* species: biovar orientalis and biovar officinalis. *Syst Appl Microbiol* 24: 192–205.

Rajkumar, M., Prasad, M. N. V. y Freitas, H. (2010) Potential of siderophore producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol* 28: 142–149.

Ramírez-Bahena, M. H., García-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J. M., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. y Velázquez, E. (2008) Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 2484–2490.

Rao, D. L. N. y Sharma, P. C. (1995) Effectiveness of rhizobial strains for chickpea under salinity stress and recovery of nodulation on desalinization. *Indian J Exp Biol* 33: 500–504.

Remigi, P., Zhu, J., Young, J. P. W., Masson-Boivin C. (2015) Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing Legume Symbionts. *Trends in Microbiology* 24 (1): 63–75.

Rensing, C., Mitra, B. y Rosen, B. P. (1997) The zntA gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1432614331.

Rigaud, J. y Puppo, A. (1975) Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J Gen Microbiol* 88: 223–228.

Rinaudi, L. V. y Giordano, W. (2010) An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiol Lett* 304: 1–11.

Rincón-Rosales, R., Lloret, L., Ponce, E. y Martínez-Romero, E. (2009) Rhizobia with different symbiotic efficiencies nodulate *Acaciella angustissimain* Mexico, including *Sinorhizobium chiapanecum* sp. nov. which has common symbiotic genes with *Sinorhizobium mexicanum*. *FEMS Microbiol Ecol* 67: 103–117.

Ritsema, T., Wijfjes, A. H. M., Lugtenberg, B. J. J y, Spaink, H. P. (1996) *Rhizobium* nodulation protein NodA is a host-specific determinant of the transfer of fatty acids in Nod factor biosynthesis. *Mol Gen Genet* 251: 44–51.

Rivas, R., García-Fraile, P. y Velázquez, E. (2009) Taxonomy of Bacteria nodulating Legumes. *Microbiology Insights* 2: 51–69.

Rivas, R., Laranjo, M., Velázquez, E., Mateos, P. F., Oliveira, S. y Martínez-Molina, E. (2007) Strains of *Mesorhizobium amorphae* and *M. tianshanense* carrying symbiotic genes of

common chickpea endosymbiotic species constitute a novel biovar (ciceri) able to nodulate *Cicer arietinum*. *Lett Appl Microbioln* 44: 412–418.

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 Physiol*, 67: 389-400.

Roche, P., Maillet, F., Plazanet, C., Debellé, F., Ferro, M., Truchet, G., Promé, J. C. y Dénarié, J. (1996) The common *nodABC* genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 15305–15310.

Rodríguez, H. y Fraga, R., (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role inplant growth promotion. *Biotechnol Adv* 17: 319–339.

Rodríguez-Navarro, D. N., Dardanelli, M. S. y Ruíz-Saínz, J. E. (2007) Attachmentof bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiol Lett* 272: 127–136.

Rogel, M. A., Hernández-Lucas, I., Kuykendall, L. D., Balkwill, D. L. y Martínez Romero, E. Nitrogen-fixing nodules with Ensifer adhaerens harborin Rhizobium tropicisymbiotic plasmids. (2001) *Appl Environ Microbiol* 67(7): 3264–3268.

Rogel, M. A., Ormeño-Orrillo, E., Martínez Romero, E. (2011) Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst Appl Microbiol* 34: 96–104.

Röhrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U., Kondorosi, E., Barlier, I., Schell, J. y John, M. (1994) Biosynthesis of lipooligosaccharide nodulation factors: *Rhizobium* NodA protein is involved in N-acylation of the chitooligosaccharide backbone. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3122–3126.

Rome, S., Fernández, M. P., Brunel, B., Normand, P y Cleyet-Marel, J. C. (1996) *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int J Syst Evol Microbiol* 46(4): 972-80.

Rossbach, S., Mai, D. J., Carter, E. L., Sauviac, L., Capela, D., Bruand, C., de Bruijn, J. (2008) *Sinorhizobium meliloti* to elevated concentrations of cadmium and zinc. *Appl Environ Microbiol* 74: 4218–4221.

Rostas, K., Kondorosi, E., Horvath, B., Simoncsits, A. y Kondorosi, A. (1986) Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in Rhizobium. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1757-1761.

Rozema, J. y Flowers, T., (2008). Crops for a salinized world. *Science* 322: 1478-1480.

Rubio-Sanz, L. (2014). Análisis molecular de sistemas génicos implicados en la homeostasis de níquel y eficiencia simbiótica en *Rhizobium leguminosarum*. Tesis doctoral.

Ruiz, F. (2001) Trace metals in estuarine sediments of southwestern Spain. *Mar Pollut Bull*. 42: 481-489.

Ruiz-Díez, B., Fajardo, S., de Felipe, M. R., Fernández-Pascual, M. (2012) Characterization of rhizobia from legumes of agronomic interest grown in semi-arid areas of Central Spain relates genetic differences to soil properties. *Journal of Basic Microbiology*, 52: 66–78.

Sadowsky, M. J., Cregan, P. B., Gottfert, M., Sharma, A., Gerhold, D., Rodríguez-Quinones, F., Keyser, H. H., Hennecke, H., y Stacey, G. (1991) The *Bradyrhizobium japonicum* nolA gene and its involvement in the genotype-specific nodulation of soybeans. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 637-641.

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. *Cell Mol Life Sci* 68: 1327–1339.

Saier Jr., M.H., Tam, R., Reizer, A. y Reizer, J. (1994) Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol* 11: 841-847.

Saiki, R. K. (1990) Amplification of genomic DNA. En *PCR Protocols. A guide of methods and applications*, Editores: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. y White, T.J. Academic Press Inc., (EEUU). pp. 13-20.

Saitou, N. y Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-426.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, Nueva York (EEUU).

Sauvage, D., Hamelia, J. y Lacher, F. (1983) Glycine betaine and other structurally related compounds improve the salt tolerance of *Rhizobium meliloti*. *Plant Sci Lett* 31: 291–302.

Schäfer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. y Puhler, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145: 69-73.

Scheidle, H., Große, A. y Niehaus, K. (2005) The Lipid A substructure of the *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides is sufficient to suppress the oxidative burst in host plants. *New Phytol* 165: 559–566.

Schlaman, H. L., Phillips, D. A. y Kondorosi, E. (1998) En *The Rhizobiaceae*. Spaink, H. P., Kondorosi, A. y Hooykaas, P. J. J. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 361–386.

Selvaraj, S., Saha, K., Chakraborty A, Bhattacharyya, S. N. y Saha, A. (2009) Toxicity of free and various aminocarboxylic ligands sequestered copper (II) ions to *Escherichia coli*. *J Hazard Mater* 30: 2-3.

Sensfuss, C. y Schlegel, H. G. (1988) Plasmid pMOL28-encoded resistance to nickel is due to speciffic efflux. *FEMS Microbiol Lett* 55: 295-298.

Shekhar, C. (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 170: 265-270.

Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., Gobi, T. A. (2013) Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus* 2, 587.

Silva, C., Vinuesa, P., Eguiarte, L. E., Souza, V. y Martínez-Romero, E. (2005) Evolutionary genetics and biogeographic structure of *Rhizobium gallicum* sensu lato, a widely distributed bacterial symbiont of diverse legumes. *Mol Ecol* 14: 4033–4050.

Skorpil, P., Saad, M. M., Boukli, N. M., Kobayashi, H., Ares-Orpel, F., Broughton, W. J. y Deakin, W. J. (2005) NopP, a phosphorylated effector of Rhizobium sp. strain NGR234, is a major determinant of nodulation of the tropical legumes *Flemingia congesta* and *Tephrosia vogelii*. *Mol Microbiol* 57: 1304–1317.

Smith, L. T., Allaith, A. M. y Smith, G. M. (1994) a Mechanism of osmotically-regulated N-acetylglutaminylglutamine amide production in *Rhizobium meliloti*. *Plant Soil* 161: 103–108.

Smith, L. T., Smith, G. M., Desouza, M. R., Pocard, J. M., Le Rudulier, D. y Madkour, M. A. (1994) b Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: mechanism and control by other environmental signals. *J Exp Zool* 268: 162–165.

Smith, L. T., Pocard, J. A., Bernard, T. y Le Rudulier, D. (1988). Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 170: 3142–3149.

Schmidt, T. y Schlegel, H. G. (1994) Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the ncc locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J Bacteriol* 176: 7045-7054.

Silva, C., Kan, F. L. y Martínez-Romero, E. (2007) Population genetic structure of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* isolated from nodules of *Medicago* spp. in Mexico. *FEMS Microbiol Ecol* 60: 477-489.

Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517.

Spada, S., Pembroke, J. T. and Wall, J. G. (2002) Isolation of a novel *Thermus thermophilus* metal efflux protein that improves *Escherichia coli* growth under stress conditions. *Extremophiles* 6: 301-308.

Spaepen, S., Vanderleyden, J. y Remans, R. (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31: 425–448.

Spaink, H. P. (1996) Regulation of plant morphogenesis by lipo-chitin oligosaccharides. *Crit Rev Plant Sci* 15: 559–582.

Spaink, H. P., Bloemberg, G. V., van Brussel, A. A. N, Lugtenberg, B. J. J., van der Drift, K. M. G. M., Haverkamp, J. y Thomas-Oates, J. E. (1995) Host specificity of *Rhizobium*

leguminosarum is determined by the hydrophobicity of highly unsaturated fatty acyl moieties of the nodulation factors. *Mol Plant-Microbe Interact* 8: 155–164.

Spaink, H. P., Kondorosi, A., Hooykaas, P. J. J. (1998) En *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria.* Dordrecht: Kluwer Acad. 566 pp.

Spaink, H. P., Sheeley, D. M., van Brussel, A. A. N., Glushka, J., York, W. S., Tak, T., Geiger, O., Kennedy, E. P., Reinhold, V. N. y Lugtenberg, B. J. J. (1991). A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature* 354: 125-130.

Spaink, H. P., Wijfjes, A. H. M., van der Drift, K. M. G. M., Haverkamp, J., Thomas-Oates, J. E. y Lugtenberg, B. J. J. (1994) Structural identification of metabolites produced by the NodB and NodC proteins of *Rhizobium leguminosarum*. *Mol Microbiol* 13: 821–831.

Sprent, J. I. (2001) Nodulation in Legumes. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.

Sprent, J. I., y Zahran, H. H. (1988) Infection, development and functioning of nodules under drought and salinity. En *Nitrogen fixation by legumes in Mediterranean agriculture.* Beck, D. P. y. Materon, L. A. pp. 145–151.

Steenkamp, E. T., Stepkowski, T., Przymusiak, A., Botha, W. J. y Law, I. J. (2008) Cowpea and peanut in southern Africa are nodulated by diverse *Bradyrhizobium* strains harboring nodulation genes that belong to the large pantropical clade common in Africa. *Mol Phylogenet Evol* 48: 1131–1144.

Stepkowski, T., Hughes, C. E., Law, I. J, Markiewicz, L., Gurda, D., Chlebicka A. y Moulin, L. (2007). Diversification of lupine *Bradyrhizobium* strains: evidence from nodulation gene trees. *Appl Environ Microbiol* 73: 3254–3264.

Sturr, M. G., Ablooglu, A. J. y Krulwich, T. A. (1997) A Bacillus subtilis locus encoding several gene products affecting transport of cation. *Gene* 188: 91-94.

Sudhakar, P., Chattopadhyay, G. N., Gangwar, S. K. y Ghosh, J. K. (2000) Effect of foliar application of *Azotobacter*, *Azospirillum* and *Beijerinckia* on leaf yield and quality of mulberry (*Morus alba*). *J Agric Sci* 134: 227–234.

Sugawara, M., Epstein, B., Badgley, B., Unno, T., Xu, L., Reese, J., Gyaneshwar, P., Denny, R., Mudge, J., Bharti, A. K., Farmer, A. D., May, G. D., Woodward, J. E., Médigue, C., Vallenet, D., Lajus, A., Rouy, Z., Martínez-Vaz, B., Tiffin, P., Younh, N. D., Sadowsky, M. J. (2013) Comparative genomics of the core and accessory genomes of 48 *Sinorhizobium* strains comprising five genospecies. *Genome Biol* 14: R17.

Sullivan, J. T., Trzebiatowski, J. R., Cruickshank, R. W., Gouzy, J., Brown, S. D., Elliot, R. M., Fleetwood, D. J., McCallum, N. G., Rossbach, U., Stuart, G. S., Weaver, J. E., Webby, R J., de Bruijn, F. J., Ronson, C. W. (2002) Comparative Sequence Analysis of the Symbiosis Island of *Mesorhizobium loti* Strain R7A. *J Bacteriol* 184: 3086–3095.

Sullivan, J. T. y Ronson, C. W. (1998) Evolution of rhizobia by acquisition of a 500 kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5145–5149.

Surin, B. P. y Downie, J. A. (1988). Characterization of the *Rhizobium leguminosarum* genes *nodLMN* involved in efficient host-specific nodulation. *Mol Microbiol* 2: 173-183.

Sutherland, I. W. (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147: 3-9.

Talebi, M. B., Bahar, M., Saeidi, G., Mengoni, A., Bazzicalupo, M. (2008) Diversity of *Sinorhizobium* strains nodulating *Medicago sativa* from different Iranian regions. *FEMS Microbiol Lett* 288: 40–46.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. y Kumar, S. (2007) MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596–1599.

Tang, C. y Thomson, B. D. (1996) Effects of solution pH and bicarbonate on the growth and nodulation of a range of grain legumes. *Plant Soil* 186: 321–330.

Tate, R. L. (1995) Soil microbiology (symbiotic nitrogen fixation), Wiley, J. y Sons, Inc., New York, N.Y. p. 307– 333.

Tellstrom, V., Usadel, B., Thimm, O., Stitt, M., Kuster, H., Niehaus, K. (2007) The lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* suppresses defense-associated gene expression in cell cultures of the host plant *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 143: 825–837.

Terpolilli, J. J., Hood, G. A. y Poole, P. S. (2012) What determines the efficiency of N_2 fixing *Rhizobium*-legume symbioses? *Adv Microb Physiol* 60: 325–389.

Thies, J. E., Woomer P. L. y Singleton, P. W. (1995) Enrichment of *Bradyrhizobium* spp. populations in soil due to cropping of the homologous host legume. *Soil Biol Biochem* 27: 633–636.

Thomas, R. J., Askawa, N. M., Rondon, M. A. y Alarcon. H. F. (1997) Nitrogen fixation by three tropical forage legumes in an acid soil savanna of Colombia. *Soil Biol Biochem* 29: 801–808.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D. G. (1997) CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876–4882.

Tibazarwa, C., Wuertz, S., Mergeay, M., Wyns, L. y van der Lelie, D. (2000) Regulation of the cnr cobalt and nickel resistance determinant of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) CH34. *J Bacteriol* 182: 1399-1409.

Tiwari, R. P., Reeve, W. G. y Glenn, A. R. (1992). Mutation conferring acid sensitivity in the acid tolerant strains *Rhizobium meliloti* WSM419 and *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* WSM 710. *FEMS Microbiol Lett* 100: 107–112.

Tottey, S., Harvie, D. R., Robinson, N. J., (2007). Understanding how cells allocate metals. En *Molecular microbiology of heavy metals.* Nies, D., Silver, S. New York: Springer. pp. 3-36.

Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., de Billy, F., Promé, J. C. y Denarié, J. (1991) Sulphated lipooligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* 351: 670-673.

Tseng, T. T., Gratwick, K. S., Kollman, J., Park, D., Nies, D. H., Goffeau, A. y Saier, M. H. J. (1999) The RND superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1: 107- 125.

Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N. y Matsuguchi, T. (1995) Phylogeny of Symplasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of a nodC segment. *J Bacteriol* 177: 468–472.

Udvardi, M. y Poole, P. S. (2013) Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu Rev Plant Biol* 64, 781–805.

Valencia, E. Y., Braz, V. S., Guzzo, C. y Marques, M.V. (2013) Two RND proteins involved in heavy metal efflux in *Caulobacter crescentus* belong to separate clusters within proteobacteria. *BMC Microbiology* 13: 79.

Valverde, A., Igual, J. M., Peix, A., Cervantes, E., y Velázquez, E. (2006) *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 2631–2637.

Van de Velde, W., Zehirov, G., Szatmari, A., Debreczeny, M., Ishihara, H., Kevei, Z., Farkas, A., Mikulass, K., Nagy, A., Tiricz, H., Satiat-Jeunemaitre, B., Alunni, B., Bourge, M., Kucho, K., Abe, M, Kereszt, A., Maroti, G., Uchiumi, T., Kondorosi, E. y Mergaert, P. (2010) Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science* 327: 1122–1126.

Van der Lelie, D., Schwuchow, T., Schwidetzky, U., Wuertz, S., Baeyens, W., Mergeay, M. and Nies, D. H. (1997) Two component regulatory system involved in transcriptional control of heavy metal homoeostasis in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol Microbiol* 23: 493- 503.

Versalovic, J., Koeuth, T. y Lupski, J. R. (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes *Nucleic Acids Res* 19(24): 6823–6831.

Vasse, J., de Billy, F., Camut, S., y Truchet, G. (1990) Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol* 172: 4295–4306.

Velagaleti, R. R., Marsh, S., Kramer, D., Fleischman, D. y Corbin, J. (1990) Genotyping differences in growth and nitrogen fixation soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars grown under salt stress. *Trop Agric* 67: 169–177.

Villegas, M. C., Rome, S., Mauré, L., Domerguea, L., Gardan, O., Bailly, X., Cleyet-Marel, J. C. y Brunel, B. (2006) Nitrogen-fixing sinorhizobia with *Medicago laciniata* constitute a novel biovar (bv. medicaginis) of *S. meliloti*. *Syst Appl Microbiol* 29: 526–538.

Vinuesa, P., León-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo A., Pérez-Galdona, R., Werner, D. y Martínez-Romero, E. (2005)a *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. genistearum, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 569–575.

Vinuesa, P., Silva, C., Lorite, M. J., Izaguirre-Mayoral, M. L., Bedmar, E. J. y Martínez-Romero, E. (2005)b Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD, recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. *Syst Appl Microbiol* 28: 702–716.

Viprey, V., Del-Greco, A., Golinowski, W., Broughton, W. J. y Perret, X. (1998) Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium. Mol Microbiol* 28: 1381–1389.

Vollmer, S. J., Switzer, R. L., Hermodson, M. A., Bower, S. G. y Zalkin, H. (1983) The glutamine-utilizing site of *Bacillus subtilis* glutamine phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase. *J Biol Chem* 258: 10582-10585.

Walker, J. F., Gay, N. J., Saraste, M. y Eberle, A. N. (1984) DNA sequence around the *Escherichia coli unc* operon. *Biochem J* 224: 799-815.

Walsh, K. B. (1995) Physiology of the legume nodule and its response to stress. *Soil Biol Biochem* 27: 637–655.

Wang, D., Yang, S., Tang, F., y Zhu, H. (2012) Symbiosis specificity in the legume-rhizobial mutualism. *Cell Microbiol* 14: 334–342.

Wang, E. T., Rogel, M. A., García-De los Santos, A., Martínez-Romero, J., Cevallos, M. A. y Martínez-Romero, E. (1999) *Rhizobium etli* bv. mimosae, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *Int J Syst Bacteriol* 49: 1479–1491.

Wang, W., Gufanti, A. A., Wei, Y., Ito, M. y Krulwich, T. A. (2000) Two types of *Bacillus subtilis* tetA(L) deletion strains reveal the physiological importance of TetA(L) in Kþ acquisition as well as in Naþ, alkali, and tetracycline resistance. *J Bacteriol* 182: 2088- 2095.

Wei, G. H., Tan, Z. Y., Zhu, M. E., Wang, E. T., Han, S. Z y Chen, W. X. (2003) Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53: 1575-1583.

Whiting, N. S., de Souza, P. M. y Terry, N. (2001) Rhizosphere bacteriamobilize Zn for hyperaccumulation by Thlaspi caerulescens. *Environ Sci Technol* 35: 3144–3150.

Willis, L. B. y Walker, G. C. (1999) A novel *Sinorhizobium meliloti* operon encodes an alpha-glucosidase and a periplasmic binding-protein-dependent transport system for alpha-glucosides. *J Bacteriol* 181: 4176–4184.

Wojciechowski, M. F., Sanderson, M. J., Steele, K. P. y Liston, A. (2000) Molecular phylogeny of the 'Temperate Herbaceous Tribes' of Papilionoid legumes: a supertree approach. En *Advances in Legume Systematics 9*. Herendeen, P.S. y Bruneau, A. Kew. Royal Botanic Gardens, pp. 277–298.

Xie, P., Hao, X., Herzberg, M., Luo, Y., Nies D. H., Wei, G. (2015). Genomic analyses of metal resistance genes in three plant growth promoting bacteria of legume plants in Northwest mine tailings, China. *Journal of environmental sciences* 27: 179–187.

Yang, G. P., Debellé, F., Savagnac. A., Ferro, M., Schiltz, O., Maillet, F., Promé, D., Treilhou, M., Vialas, C., Lindstrom, K., Dénarié, J. y Promé, J. C. (1999) Structure of the *Mesorhizobium huakuii* and *Rhizobium galegae* Nod factors: a cluster of phylogenetically related legumes are nodulated by rhizobia producing Nod factors with α, β–unsaturated N-acyl substitutions. *Mol Microbiol* 34: 227–237.

Yang, S. M., Tang, F., Gao, M. Q., Krishnan, H. B. y Zhu, H. Y. (2010) R gene-controlled host specificity in the legume-rhizobia symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 18735-18740.

Yelton, M. M., Yang, S. S., Edie, S. A. y Lim, S. T. (1983) Characterization of an effective salt-tolerant fast-growing strain of *Rhizobium japonicum*. *J Gen Microbiol* 129: 1537–1547.

Yeung, A. T. Y., Parayno, A. y Hancock, R. E. W. (2012) Mucin promotes rapid surface motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 3, e00073-12.

York, G. M. y Walker, G. C. (1997) The *Rhizobium meliloti exoK* gene and *prsD/prsE/exsH* genes are components of independent degradative pathways which contribute to production of lowmolecular- weight succinoglycan. *Mol Microbiol* 25: 117–134.

Yso, J. Y., Salkin, H., van Cleemput, M., Yanofsky, C. y Smith, J. M. (1982) Nucleotide sequence of *Escheriehia coli purF* and deduced aminoacid sequence of glutamine phosphoribosylpyrophosphateamidotransferase. *J Biol Chem* 257: 3525-3531.

Zahran, H. H. (1991) a Variation in growth pattern of three Egyptian strains of *Rhizobium leguminosarum* grown under sodium chloride and ammonium nitrate treatments. *Bull Fac Sci Assiut Univ* 20: 161–169.

Zahran, H. H. (1991) b Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline environments. *Biol Fertil Soils* 12: 73–80.

Zahran, H. H. (1986) Effect of sodium chloride and polyethylene glycol on rhizobial root hair infection, root nodule structure and symbiotic nitrogen fixation in *Vicia faba* L. plants. Ph.D. thesis. Dundee University, Dundee, Scotland.

Zahran, H. H. (1999) Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microbiol Mol Biol Rev* 63(4): 968-989.

Zahran, H. H., y Sprent, J. I. (1986) Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta* 167: 303–309.

Zahran, H. H., y Abu-Gharbia, M. A. (1995) Development and structure of bacterial root-nodules of two Egyptian cultivars of *Vicia faba* L. under salt and water stresses. *Bull Fac Sci Assiut Univ* 24: 1–10.

Zahran, H. H., Mohammad, E. M., Emam, M. M. y Ismael, S. S. (1997) The chemical composition, structure and ultrastructure of a halotolerant rhizobia isolated from Egypt. En *Proceedings of the 9th Microbiology Conference*. pp. 121–148.

Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, J. C., Gillis, M., Dreyfus, B., de Lajudie, P. (2004) Characterisation of a wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *Syst Appl Microbiol* 27: 380–395.

Zgurskaya, H. I. y Nikaido, H. (2000) a Multidrug resistance mechanism: drug efflux across two membranes. *Mol Microbiol* 37: 219-225.

Zgurskaya, H. I. y Nikaido, H. (2000) b Cross-linked complex between oligomeric periplasmic lipoprotein AcrA and the inner-membrane- associated multidrug efflux pump AcrB from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 182: 4264-4267.

Zhang, J. H. y Min, H. (2010) Characterization of a multimetal resistant Burkholderia fungorum isolated from an e-waste recycling area for its potential in Cd sequestration. *World J Microb Biotechnol* 26: 371-374.

Zhang, Y. F., He, L. Y., Chen, Z. J., Zhang, W. H., Wang, Q. Y., Qian, M. y Sheng, X. F. (2011) Characterization of lead-resistant and ACCdeaminase-producing endophytic bacteria and their potential in promoting lead accumulation of rape. *J Hazard Mater* 186: 1720–1725.

Zhang, Y., Rodionov, D. A., Gelfand, M. S. y Gladyshev, V. N. (2009) Comparative genomic analyses of nickel, cobalt and vitamin B12 utilization. *BMC Genomics* 10: 78-104.

Zhao, C. T., Wang, E. T., Chen, W. F. y Chen, W. X. (2008) Diverse genomic species and evidences of symbiotic gene lateral transfer detected among the rhizobia associated with Astragalus species grown in the temperate regions of China. *FEMS Microbiol Lett* 286: 263–273.

Zribi, K., Mhamdi, R., Huguet, T. y Aouani, M. E. (2004) Distribution and genetic diversity of rhizobia nodulating natural populations of *Medicago truncatula* in Tunisian soils. *Soil Biol Biochem* 36: 903–908.