

Departamento de Microbiología

Facultad de Biología



**Implicación del sistema de secreción de tipo 3 de
Sinorhizobium (Ensifer) fredii HH103 en la modulación de la
respuesta de defensa de *Glycine max* cv. Williams y estudio de
los efectores específicos secretados a través de este sistema**

Irene Jiménez Guerrero

Sevilla, 2015

Departamento de Microbiología

Facultad de Biología



**Implicación del sistema de secreción de tipo 3 de
Sinorhizobium (Ensifer) fredii HH103 en la modulación de la
respuesta de defensa de *Glycine max* cv. Williams y estudio de
los efectores específicos secretados a través de este sistema**

**Memoria presentada por la Licenciada en Biología Irene Jiménez Guerrero para
optar al grado de Doctor.**

Sevilla, 2015

Departamento de Microbiología

Facultad de Biología



LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Fdo. Dr. Fco. Javier Ollero Márquez y Dr. Fco. Javier López Baena

Catedrático y Contratado doctor

Departamento de Microbiología

Universidad de Sevilla

Fdo. Irene Jiménez Guerrero



*Mi agradecimiento al Plan Propio de la Universidad de Sevilla por haber
hecho posible la realización de este trabajo.*

“... Se debe hacer por sí mismo, por la belleza de la ciencia y, a continuación, siempre existe la posibilidad de que un descubrimiento científico pueda llegar a ser un beneficio para la humanidad.”

Marie Curie

Índice

Introducción

1. La simbiosis <i>Rhizobium</i> –Leguminosa.	1
2. Sistemas de secreción de proteínas en bacterias Gram-negativas.	6
2. 1. El sistema de secreción de tipo 3 (T3SS).	8
2. 2. Estructura del T3SS.	10
2. 3. Regulación de la actividad del T3SS en los rizobios.	14
2. 4. Implicación del T3SS de los rizobios en la simbiosis.	16
2. 5. Los efectores translocados a través del T3SS.	17
3. El sistema inmune de las plantas.	30
3. 1. Los receptores transmembrana PRR reconocen los PAMP o MAMP.	33
3. 2. Las proteínas R, receptores de los efectores bacterianos.	35
3. 3. Respuestas de defensa activadas durante la PTI y la ETI.	37

Material y Métodos

1. Material y Métodos relacionados con bacterias.	49
1. 1. Estirpes bacterianas y agentes selectivos e identificativos.	49
1. 1. 1. Estirpes bacterianas.	49
1. 1. 2. Agentes selectivos e identificativos y flavonoides.	59
1. 2. Medidas de pH, densidad óptica y solución de congelación.	59
1. 3. Medios de cultivo.	60
1. 3. 1. Medios de cultivo para <i>Sinorhizobium</i>	60
1. 3. 2. Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> CV3101 y <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1.	60
1. 4. Métodos relacionados con los ácidos nucleicos bacterianos.	61
1. 4. 1. Métodos de transferencia de ADN.	61
1. 4. 2. Extracción del ADN genómico.	63

1. 4. 3. Extracción del ADN plasmídico.....	64
1. 4. 4. Restricción del ADN.	65
1. 4. 5. Electroforesis del ADN.	65
1. 4. 6. Aislamiento del ADN de geles de agarosa.	66
1. 4. 7. Desfosforilación del ADN.	66
1. 4. 8. Conversión de extremos cohesivos en romos.....	66
1. 4.9. Ligación del ADN.	67
1. 4. 10. Amplificación del ADN por PCR.....	67
1. 4. 11. Mutagénesis <i>in vitro</i> por delección mediante PCR solapante.	71
1. 4. 12. Hibridación ADN:ADN.....	73
1. 4. 13. Secuenciación del ADN.	75
1. 4. 14. Análisis informático de secuencias de ADN.	75
1. 4. 15. Cuantificación de la expresión de genes bacterianos mediante <i>q</i> PCR.	75
1. 5. Técnicas relacionadas con las proteínas.	76
1. 5. 1. Extracción de las proteínas extracelulares de <i>S. fredii</i> HH103.	76
1. 5. 2. Cuantificación de proteínas	77
1. 5. 3. Electroforesis unidireccional de las proteínas	77
1. 5. 4. Tinción de las proteínas con azul de Coomassie.	78
1. 5. 5. Tinción de las proteínas con plata.	78
1. 5. 6. Inmunodetección de las proteínas.....	79
1.5. 7. Expresión y purificación de proteínas de fusión a la Glutación S-Transferasa (GST).....	80
<i>Expresión de proteínas de fusión unidas a GST</i>	80
1. 5. 8. Análisis informático relacionado con proteínas.	82
2. Material y métodos utilizados para los estudios con plantas.....	83
2. 1. Plantas.....	83
2. 2. Soluciones nutritivas para las plantas.	83

2. 3. Desinfección y germinación de semillas.	84
2. 4. Inoculación y cultivo de plantas.	84
2. 5. Ensayos de nodulación.	85
2. 6. Extracción y cuantificación de los pigmentos fotosintéticos.	86
2. 7. Utilización de bioluminiscencia para el estudio de la expresión de promotores de <i>S. fredii</i> HH103 <i>in vivo</i> en simbiosis con soja Williams.	86
2. 8. Cuantificación de hormonas.	87
2. 8. 1. Extracción y cuantificación de ácido salicílico usando el biosensor <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1.	87
2.8. 2. Cuantificación de ácido salicílico, ácido abscísico y ácido jasmónico-isoleucina mediante HPLC.	89
2.8. 3. Cuantificación de etileno por cromatografía de gases.	91
2.9. Medida de la producción de ácido malondialdehído (MDA).	91
2.10. Detección de depósitos de calosa.	92
2.11. Detección de tejidos necróticos en hojas de soja.	92
2. 12. Cuantificación de la expresión de genes de soja mediante <i>q</i> PCR.	93
2. 13. Técnicas relacionadas con las proteínas.	94
2. 13. 1. Preparación de un extracto proteico para la inmunodetección.	94
2. 13. 2. Ensayo de fosforilación <i>in vitro</i>	95
<i>Experimentos de fosforilación de proteínas</i>	96
<i>Ensayo de fosforilación en gel</i>	97
2. 13. 3. Ensayo de inmunoprecipitación.	99
2. 13. 4. Secuenciación de las proteínas.	101
2. 13. 5. Expresión transitoria de genes bacterianos en hojas de <i>N. benthamiana</i>	102
2. 13. 6. Estudio de la translocación de los efectores riobianos al interior de la célula de la raíz de la planta.	103
2. 13. 7. Actividades enzimáticas.	104
3. Material y Métodos relacionados con levaduras.	106

3. 1. Levaduras y plásmidos.	106
3. 2. Método y solución de congelación.	106
3. 3. Medios de cultivo para <i>S. cerevisiae</i>	107
3. 4. Transformación en <i>S. cerevisiae</i>	107
3. 5. Determinación de la función de efectores del T3SS mediante el uso de un <i>array</i> de levaduras.	108

Objetivos

Objetivos.....	115
----------------	-----

Resultados (Bloque I)

1. La interrupción de la secreción de efectores a través del T3SS de <i>S. fredii</i> HH103 genera una disminución y un retraso en la formación de nódulos en soja Williams que están relacionados con una reducción de la expresión de los genes tempranos de nodulación <i>GmNIN</i> y <i>GmENOD40</i>	119
1. 1. Cinética de nodulación de <i>S. fredii</i> HH103 en soja Williams.	119
1. 2. Estudio de la expresión <i>in vivo</i> de los genes del T3SS de <i>S. fredii</i> HH103 en la simbiosis con la soja Williams.	127
2. Moléculas de <i>S. fredii</i> HH103 inducen una respuesta de defensa primaria en soja Williams.	134
2. 1. La inoculación de la raíz de soja Williams con <i>S. fredii</i> HH103 induce la formación de depósitos de calosa.	134
2. 2. <i>S. fredii</i> HH103 induce la expresión de peroxidasas en la raíz de soja Williams.	135
2. La respuesta de defensa inducida por <i>S. fredii</i> HH103 en soja Williams está mediada por la producción de SA y es suprimida por el T3SS.	141
2. 1. El T3SS de <i>S. fredii</i> HH103 modula el balance hormonal de SA durante la simbiosis con soja Williams.	141

2.2. El incremento de los niveles de SA producido en respuesta al mutante HH103 <i>ttsI::Ω</i> induce la expresión del gen <i>GmPRI</i> de la soja Williams.....	147
2. 3. El SA exógeno induce la expresión de los genes <i>GmPRI</i> y <i>GmPR2</i> y causa una reducción del número de nódulos en la simbiosis de <i>S. fredii</i> HH103 con la soja Williams.	150
2. 4. La inoculación de plantas de soja Williams con el mutante HH103 <i>ttsI::Ω</i> dispara una posible respuesta sistémica en la planta.....	155
2. 5. El T3SS <i>S. fredii</i> HH103 induce de forma transitoria la expresión del gen <i>GmMPK4</i> en las raíces de soja Williams.....	157

Resultados (Bloque II)

1. Caracterización del gen <i>nopL</i> de <i>S. fredii</i> HH103.....	163
1. 1. Análisis de las secuencias del gen <i>nopL</i> y de la proteína NopL de <i>S. fredii</i> HH103.	163
1. 2. Construcción de un mutante en el gen <i>nopL</i> de <i>S. fredii</i> HH103.	164
1. 3. Estudio de la regulación de la expresión gen <i>nopL</i>	168
1. 4. Efecto de la mutación del gen <i>nopL</i> sobre la secreción de las proteínas Nop.....	169
1. 5. NopL es translocada al interior de las células de la raíz de soja.	171
2. Caracterización del gen <i>nopI</i> de <i>S. fredii</i> HH103.....	173
2. 1. Identificación y análisis de las secuencias del gen <i>nopI</i> y de la proteína NopI de <i>S. fredii</i> HH103,.....	173
2. 2. Construcción de un mutante en el gen <i>nopI</i> de <i>S. fredii</i> HH103.	175
2. 3. Estudio de la regulación de la expresión del gen <i>nopI</i>	179
2. 4. Efecto de la mutación del gen <i>nopI</i> sobre la secreción de las proteínas Nop.....	180
3. Fenotipo simbiótico de los mutantes en los genes <i>nopL</i> , <i>nopI</i> y <i>ynopP</i> de <i>S. fredii</i> HH103.	183
4. Caracterización del gen <i>nopC</i> de <i>S. fredii</i> HH103.....	192

4. 1. Análisis de las secuencias del gen <i>nopC</i> y de la proteína NopC de <i>S. fredii</i> HH103.	192
4. 2. Construcción de un mutante en el gen <i>nopC</i> de <i>S. fredii</i> HH103.....	193
4. 3. Estudio de la regulación de la expresión del gen <i>nopC</i>	195
4. 4. Efecto de la mutación del gen <i>nopC</i> sobre la secreción de las proteínas Nop. ...	198
4. 5. NopC es translocado al interior de la célula de la raíz de soja.	200
4. 6. Fenotipo simbiótico del mutante en el gen <i>nopC</i>	201
4. 6. 1. El gen <i>nopC</i> de <i>S. fredii</i> HH103 posee un efecto positivo en la nodulación con soja Williams.	201
4. 6. 2. El gen <i>nopC</i> juega un papel importante en la nodulación de <i>S. fredii</i> HH103 en <i>Lotus japonicus</i>	203

Resultados (Bloque III)

1. Caracterización de la proteína NopL de <i>S. fredii</i> HH103.....	211
1. 1. La proteína NopL de <i>S. fredii</i> HH103 es fosforilada por una quinasa de raíz de soja.....	211
1. 1. 1. Expresión <i>in vitro</i> y purificación de la proteína NopL de <i>S. fredii</i> HH103.....	211
1. 1. 2. Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i> para caracterizar la quinasa que fosforila a NopL de <i>S. fredii</i> HH103.....	213
1. 1. 3. Detección de la quinasa de soja responsable de la fosforilación de NopL.....	215
1. 2. La proteína NopL de <i>S. fredii</i> HH103 se localiza principalmente en el núcleo de la célula hospedadora.	218
1. 3. Estudios para la identificación de la función del efector NopL de <i>S. fredii</i> HH103 en la célula eucariota.	220
1. 3. 1. Determinación de posibles dianas conservadas en células eucariotas para identificar la función de NopL. Uso de un <i>array</i> de levaduras.	220
1. 3. 2. Identificación de proteínas que interactúan con NopL en hojas de la planta modelo <i>Nicotiana benthamiana</i>	222
2. Caracterización de la proteína NopP de <i>S. fredii</i> HH103.....	225

2. 1. La proteína NopP de <i>S. fredii</i> HH103 es fosforilada por una quinasa de la raíz de soja.....	225
2. 1. 1. Expresión y purificación <i>in vitro</i> de la proteína NopP de <i>S. fredii</i> HH103.....	225
2. 1. 2. Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i> para caracterizar la quinasa que fosforila a NopP de <i>S. fredii</i> HH103.....	227
2. 1. 3. Detección de la quinasa de soja responsable de la fosforilación de NopP.....	229
2. 2. La proteína NopP de <i>S. fredii</i> HH103 se localiza en el núcleo y en el citoplasma de la célula hospedadora.....	231
2. 3. Estudios para la identificación de la función del efector NopP de <i>S. fredii</i> HH103 en la célula eucariota.	233
2. 3. 1. Determinación de posibles dianas conservadas en células eucariotas para identificar la función de NopP mediante el uso de un <i>array</i> de levaduras.....	233
2. 3. 2. Identificación de proteínas que interaccionan con NopP en hojas de la planta modelo <i>Nicotiana benthamiana</i>	235

Discusión

Discusión	240
-----------------	-----

Conclusiones

Conclusiones.....	274
-------------------	-----

Bibliografía

Bibliografía.....	280
-------------------	-----

Anexos

Anexos.....	316
-------------	-----

Índice de Figuras

Figura 1. Proceso de nodulación a través de la vía dependiente e independiente de los factores Nod.....	5
Figura 2. Sistemas de secreción de las bacterias Gram-negativas.....	7
Figura 3. Esquema general de la organización de las proteínas del T3SS.....	13
Figura 4. Esquema de la regulación de la secreción de Nops a través del T3SS de <i>S. fredii</i> HH103.....	15
Figura 5. Representación de la función potencial de algunos efectores secretados a través del T3SS de los rizobios.....	27
Figura 6. Modelo en <i>zig zag</i> que representa la co-evolución dinámica de la interacción planta-microorganismo.....	32
Figura 7. Posibles interacciones que pueden darse ante el reconocimiento de un rizobio por parte de la leguminosa hospedadora.....	32
Figura 8. Esquema de la mutagénesis <i>in vitro</i> por delección mediante PCR solapante...	72
Figura 9. Sistema de hidroponía en vaso de precipitado.....	84
Figura 10. Esquema del procesamiento de las muestras para la cuantificación de ácido salicílico.....	89
Figura 11. Hojas de <i>N. benthamiana</i> enumeradas por orden de altura.....	102
Figura 12. Esquema de la determinación de la función de efectores del T3SS mediante el uso de un <i>array</i> de levaduras.....	109
Figura 13. Cinética de nodulación de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 <i>tttI::Ω</i> y HH103 <i>tttI::Ω</i> (pMUS984).....	120
Figura 14. Inhibición del crecimiento de la raíz principal de plantas de soja Williams tras la inoculación con un mutante que no secreta proteínas Nop. Cultivo en jarros Leonard.....	122
Figura 15. Inhibición del crecimiento de la raíz principal de plantas de soja Williams tras la inoculación con un mutante que no secreta proteínas Nop. Cultivo en hidroponía.....	123

Figura 16. Cuantificación de los pigmentos fotosintéticos de las plantas de soja Williams inoculadas con las estirpes HH103, HH103 <i>ttsI::Ω</i> y HH103 <i>ttsI::Ω</i> (pMUS984).....	124
Figura 17. Cuantificación de la expresión relativa de los genes <i>NIN</i> de soja Williams en respuesta a la inoculación con las estirpes HH103, HH103 <i>ttsI::Ω</i> y HH103 <i>ttsI::Ω</i> (pMUS984).....	126
Figura 18. Cuantificación de la expresión relativa del gen <i>ENOD40.2</i> de soja Williams en respuesta a la inoculación con las estirpes HH103, HH103 <i>ttsI::Ω</i> y HH103 <i>ttsI::Ω</i> (pMUS984).....	127
Figura 19. Determinación de la producción de luminiscencia por las estirpes HH103 (pMUS1199) (A), HH103 (pMUS1207) (B), HH103 <i>nodD1::lacZ-Gm^R</i> (pMUS1207) (C) y HH103 <i>ttsI::Ω</i> (pMUS1207) (D) en simbiosis con soja Williams.....	129
Figura 20. Medida de la expresión <i>in vivo</i> de genes regulados por la proteína TtsI mediante la producción de luminiscencia por el biosensor HH103 (pMUS1207) en la simbiosis con soja Williams.....	130
Figura 21. Medida de la expresión <i>in vivo</i> de genes regulados por la proteína TtsI mediante la producción de luminiscencia por el biosensor HH103 (pMUS1207) en los nódulos de soja Williams.....	133
Figura 22. Depósitos de calosa en raíces de soja Williams inoculadas con las estirpes HH103, HH103 <i>ttsI::Ω</i> y HH103 <i>nodA::Ω</i> , a los 2 d.p.i.....	135
Figura 23. Cuantificación mediante <i>qPCR</i> de la expresión de genes que codifican enzimas peroxidasas en la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 <i>ttsI::Ω</i> y su derivado complementado HH103 <i>ttsI::Ω</i> (pMUS984).....	136
Figura 24. Cuantificación de las actividades enzimáticas catalasa y SOD (en gel) de la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 <i>ttsI::Ω</i> y HH103 <i>ttsI::Ω</i> (pMUS984).....	138
Figura 25. Cuantificación de MDA de la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103 y HH103 <i>ttsI::Ω</i>	140

Figura 26. Cuantificación de SA mediante el biosensor bioluminiscente <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1_ <i>lux</i> de la raíz (A) y de la hoja (B) de soja Williams inoculada con las estirpes HH103 y HH103 <i>ttsI::Ω</i>	142
Figura 27. Cuantificación de SA mediante HPLC de la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 <i>ttsI::Ω</i> y su derivado complementado HH103 <i>ttsI::Ω</i> (pMUS984).....	144
Figura 28. Cuantificación JA-ile mediante HPLC de la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 <i>ttsI::Ω</i> y de su derivado complementado HH103 <i>ttsI::Ω</i> (pMUS984).....	145
Figura 29. Cuantificación de ABA mediante HPLC de la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 <i>ttsI::Ω</i> y su derivado complementado HH103 <i>ttsI::Ω</i> (pMUS984).....	146
Figura 30. Cuantificación de ET mediante cromatografía de gases de la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 <i>ttsI::Ω</i> y su derivado complementado HH103 <i>ttsI::Ω</i> (pMUS984).....	147
Figura 31. Cuantificación mediante <i>qPCR</i> de la expresión del gen <i>GmPR1</i> en la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 <i>ttsI::Ω</i> y su derivado complementado HH103 <i>ttsI::Ω</i> (pMUS984).....	149
Figura 32. Cuantificación mediante <i>qPCR</i> de la expresión del gen <i>GmPR2</i> en la raíz de plantas de soja Williams inoculada con la estirpesilvestre HH103, el mutante HH103 <i>ttsI::Ω</i> y su derivado complementado HH103 <i>ttsI::Ω</i> (pMUS984) a los 2 d.p.i.....	150
Figura 33. Cuantificación mediante <i>qPCR</i> de la expresión de los genes <i>GmPR1</i> (A) y <i>GmPR2</i> (B) en la raíz de soja Williams tratada con SA a 1, 0,5 y 0,1 mM.....	152
Figura 34. Recuento del número de células viables en el sistema de hidroponía en vasos de precipitado con soja Williams y 0,5 mM de SA.....	153
Figura 35. Fenotipo simbiótico de las plantas de soja Williams inoculadas con la estirpe parental HH103, el mutante HH103 <i>ttsI::Ω</i> y su derivado complementado HH103 <i>ttsI::Ω</i> (pMUS984) en ausencia o presencia de 1 mM de SA.....	154

Figura 36. Respuesta de soja Williams a la inoculación en las hojas con <i>P.syringae</i> y preinoculada en la raíz con las estirpes HH103, HH103 <i>ttsI::Ω</i> y HH103 <i>ttsI::Ω</i> (pMUS984).....	156
Figura 37. Cuantificación mediante <i>qPCR</i> de la expresión del gen <i>GmMPK4</i> de la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 <i>ttsI::Ω</i> y HH103 <i>ttsI::Ω</i> (pMUS984).....	158
Figura 38. Inmunodetección de la proteína MPK4 en la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 <i>ttsI::Ω</i> y HH103 <i>ttsI::Ω</i> (pMUS984).....	158
Figura 39. Cuantificación mediante <i>qPCR</i> de la expresión del gen <i>GmWRKY33</i> de la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 <i>ttsI::Ω</i> y HH103 <i>ttsI::Ω</i> (pMUS984).....	159
Figura 40. Esquema de los procesos activados en la raíz de soja Williams mediante la inoculación con la estirpe parental HH103 y el mutante carente del T3SS HH103 <i>ttsI::Ω</i>	160
Figura 41. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína NopL de <i>S. fredii</i> HH103 con las correspondientes proteínas homólogas de <i>S. fredii</i> NGR234, <i>S. fredii</i> USDA257 y <i>B. elkanii</i> USDA61.....	163
Figura 42. Esquema de la mutagénesis <i>in vitro</i> del gen <i>nopL</i> mediante la inserción del interposón Ω	165
Figura 43. Comprobación mediante hibridación del mutante HH103 <i>nopL::Ω</i>	166
Figura 44. Esquema de la construcción del plásmido pMUS1191 para complementar la mutación en el gen <i>nopL</i>	167
Figura 45. Análisis por <i>qPCR</i> de la expresión del gen <i>nopL</i> de HH103.....	168
Figura 46. A, perfil de las proteínas extracelulares. B, inmunodetección de la proteína NopL.....	170
Figura 47. Esquema de la construcción del plásmido utilizado para la cuantificación de AMPc en las raíces de soja Williams.....	171

Figura 48. Cuantificación de AMPc de la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 (<i>nopL-cya</i>) y HH103 <i>ttsI::Ω (nopL-cya)</i>	172
Figura 49. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína NopI de <i>S. fredii</i> HH103 con las proteínas de <i>S. fredii</i> USDA257 y de <i>Ensifer</i> sp. TW10.....	173
Figura 50. Predicción de los aminoácidos fosforilables de la proteína NopI de HH103 utilizando el programa “NetPhos 2.0 Server”.....	174
Figura 51. Construcción del mutante SVQ707 (= HH103 <i>nopIΔ</i>) por delección mediante PCR solapante.....	176
Figura 52. Comprobación del mutante HH103 <i>nopIΔ</i> mediante PCR.....	177
Figura 53. Esquema de la construcción del plásmido pMUS1215 para complementar la mutación de <i>nopI</i>	178
Figura 54. Análisis por <i>q</i> PCR de la expresión del gen <i>nopI</i> de HH103.....	179
Figura 55. Perfil de las proteínas extracelulares procedentes de cultivos de las estirpes HH103, HH103 <i>nopIΔ</i> y HH103 <i>nopIΔ</i> (pMUS1215) crecidas en presencia (+) o ausencia (-) de genisteína a una concentración de 3,7 μM.....	181
Figura 56. Aspecto de las plantas de soja Williams inoculadas con las estirpes <i>S. fredii</i> HH103 y diversos mutantes relacionados con el T3SS, afectados en los genes <i>nopL</i> , <i>nopP</i> y <i>nopI</i>	185
Figura 57. Aspecto de la parte aérea de plantas de <i>V. unguiculata</i> inoculadas con las estirpes <i>S. fredii</i> HH103 y diversos mutantes relacionados con el T3SS, afectados en los genes <i>nopL</i> , <i>nopP</i> y <i>nopI</i>	190
Figura 58. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína NopC de <i>S. fredii</i> HH103 con las correspondientes proteínas homólogas de <i>S. fredii</i> NGR234, <i>S. fredii</i> USDA257 y <i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099.....	192
Figura 59. Comprobación del mutante HH103 <i>nopCΔ</i> mediante PCR.....	194
Figura 60. Análisis por <i>q</i> PCR de la expresión del gen <i>nopC</i> de <i>S. fredii</i> HH103.....	195

Figura 61. Análisis por <i>q</i> PCR de la expresión de los genes <i>nopA</i> (A) y <i>nodA</i> (B) de <i>S. fredii</i> HH103.....	196
Figura 62. A, perfil de las proteínas extracelulares. B, inmunodetección de la proteína NopC.....	198
Figura 63. Cuantificación de AMPc de la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 (<i>nopC-cya</i>) y HH103 <i>ttsI::Ω</i> (<i>nopC-cya</i>).....	200
Figura 64. Fenotipo simbiótico de las estirpes de <i>S. fredii</i> HH103 y HH103 <i>nopCΔ</i> . Aspecto de la parte aérea de la planta.....	202
Figura 65. Aspecto de la planta completa (columna izquierda) y detalle de la raíz (columna derecha) de <i>Lotus japonicus</i> inoculadas con <i>S. fredii</i> HH103 y diversos mutantes derivados afectados en genes relacionados con el T3SS.....	206
Figura 66. Expresión de la proteína de fusión NopL-GST en la estirpe BL21 (pMUS1135) tras la inducción del cultivo bacteriano con IPTG.....	212
Figura 67. Purificación de la proteína de fusión NopL-GST.....	212
Figura 68. Fosforilación <i>in vitro</i> de la proteína NopL por quinasas de la raíz de soja Williams.....	213
Figura 69. Fosforilación <i>in vitro</i> de la proteína NopL por quinasas de la raíz de soja Williams usando distintos inhibidores de quinasas.....	214
Figura 70. Ensayo de fosforilación "en gel".....	216
Figura 71. Inmunodetección de la proteína NopL en hojas de tabaco.....	218
Figura 72. Localización de la proteína NopL en células foliares de <i>N. benthamiana</i> ..	219
Figura 73. Localización de la proteína NopL en el núcleo de la célula foliar de <i>N. benthamiana</i>	220
Figura 74. Expresión de la proteína de fusión NopP-GST por la estirpe BL21 tras la inducción del cultivo con IPTG.....	226
Figura 75. Purificación de la proteína de fusión NopP-GST.....	226

Figura 76. Fosforilación <i>in vitro</i> de la proteína NopP por quinasas de la raíz de soja.	227
Figura 77. Fosforilación <i>in vitro</i> de la proteína NopP por quinasas de la raíz de soja Williams usando distintos inhibidores de quinasas.....	228
Figura 78. Ensayo de fosforilación “en gel”.....	229
Figura 79. Inmunodetección de la proteína NopP.....	231
Figura 80. Localización de la proteína NopP en el núcleo y el citoplasma de la célula foliar de <i>N. benthamiana</i>	232
Figura 81. Localización de la proteína NopP en el núcleo de la célula foliar de <i>N. benthamiana</i>	233
Figura 82. Procesos moleculares inducidos por <i>S. fredii</i> HH103 en la célula de la raíz de soja Williams.....	254
Figura 83. Algunas respuestas de defensas activadas en la planta debido al reconocimiento de los PAMP o MAMP del microorganismo infeccioso durante los procesos de patogénesis (MTI y ETI) y de simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa (MTI).....	257
Figura 84. Localización y fosforilación de NopL y NopP en la célula eucariota.....	267

Índice de Tablas

Tabla 1. Función, dianas, localización y mecanismo de orientación (usado para situarse en el orgánulo) de los efectores identificados en algunos géneros de bacterias patógenas de animales y plantas.....	21
Tabla 2. Efecto de la mutación del T3SS y de algunos genes <i>nop</i> sobre el comportamiento simbiótico de distintas estirpes de rizobios en sus leguminosas hospedadoras.....	28
Tabla 3. Respuestas de defensas activadas durante las respuestas PTI y ETI.....	38
Tabla 4. Estirpes derivadas de <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103 utilizadas en esta Tesis (A); Estirpes derivadas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> CV3101 utilizadas en esta Tesis (B); Estirpes derivadas de <i>Escherichia coli</i> DH5 α , BL21 y DB3.1 utilizadas en esta Tesis (C); Otras estirpes utilizadas en esta Tesis (D).....	49
Tabla 5. Cebadores utilizados en esta Tesis para amplificar fragmentos de ADN destinados para clonación.....	69
Tabla 6. Cebadores utilizados en esta Tesis para amplificar fragmentos de ADN para la mutagénesis <i>in vitro</i> por delección mediante PCR solapante.....	72
Tabla 7. Cebadores utilizados en esta Tesis para ensayos de <i>qPCR</i> de genes de <i>S. fredii</i> HH103.....	76
Tabla 8. Plantas utilizadas en esta Tesis.....	83
Tabla 9. Voltaje de cono y energías de colisión usados en el sistema HPLC para cuantificar las fitohormonas.....	90
Tabla 10. Cebadores utilizados en esta Tesis para ensayos de <i>qPCR</i> de genes de soja Williams.....	93
Tabla 11. Inhibidores de quinasas usados en esta Tesis.....	97
Tabla 12. Array de mutantes de <i>S. cerevisiae</i> BY4741 usados en esta Tesis.....	106
Tabla 13. Respuesta de soja Williams al SA exógeno y a la inoculación con la estirpe parental HH103, el mutante HH103 <i>ttsI::Ω</i> y su derivado complementado HH103 <i>ttsI::Ω</i> (pMUS984).....	155

Tabla 14. Respuesta de <i>G. max</i> cv. Williams a la inoculación con las estirpes <i>S. fredii</i> HH103 y diversos mutantes relacionados con el T3SS, afectados en los genes <i>nopL</i> , <i>nopP</i> y <i>nopI</i>	184
Tabla 15. Respuesta de plantas de <i>Sophora tomentosa</i> a la inoculación con las estirpes <i>S. fredii</i> HH103 y diversos mutantes relacionados con el T3SS, afectados en los genes <i>nopL</i> , <i>nopP</i> y <i>nopI</i>	187
Tabla 16. Respuesta de plantas de <i>V. unguiculata</i> a la inoculación con las estirpes <i>S. fredii</i> HH103 y diversos mutantes relacionados con el T3SS, afectados en los genes <i>nopL</i> , <i>nopP</i> y <i>nopI</i>	189
Tabla 17. Respuesta de soja Williams a la inoculación con las estirpes de <i>S. fredii</i> HH103 y HH103 <i>nopCΔ</i>	201
Tabla 18. Respuesta de <i>L. japonicus</i> a la inoculación con <i>S. fredii</i> HH103 y diversos mutantes derivados afectados en genes relacionados con el T3SS.....	203
Tabla 19. Proteínas de soja resultantes de la comparación de los péptidos provenientes de la secuenciación a partir de la banda recortada del ensayo de fosforilación “en gel”, representado en la Figura 70 (A).....	217
Tabla 20. Determinación de los genes de <i>S. cerevisiae</i> congruentes para NopL.....	221
Tabla 21. Identificación de las proteínas del extracto de hojas de <i>N. benthamiana</i> que interaccionan con la proteína NopL que proceden de los ensayos de inmunoprecipitación.....	223
Tabla 22. Proteínas de soja Williams resultantes de la comparación de los péptidos provenientes de la secuenciación de las proteínas de las bandas de aproximadamente 75 y 68 kDa del ensayo de fosforilación “en gel” (Figura 78).....	230
Tabla 23. Determinación de los genes de <i>S. cerevisiae</i> congruentes para NopP.....	234
Tabla 24. Análisis de los procesos celulares a través de “FuncAssociate 2.1” usando los genes congruentes para NopP.....	235

Tabla 25. Secuenciación de las proteínas del extracto de hojas de <i>N. benthamiana</i> que interaccionan con la proteína NopP, procedentes de los ensayos de inmunoprecipitación.....	236
Tabla 26. Respuesta a la inoculación de soja Williams con las estirpes de <i>S. fredii</i> HH103 HH103 <i>nodD1::Ω</i> , HH103 <i>nodD1::Ω (ttsI)</i> , HH103 <i>nodA::Tn5-lacZ</i> y HH103 (<i>ttsI</i>).....	243
Tabla 27. Efecto de la mutación del T3SS y de distintos genes <i>nop</i> sobre el comportamiento simbiótico de <i>S. fredii</i> HH103 en las leguminosas hospedadoras ensayadas en esta Tesis.....	261

Abreviaturas

ABA, ácido abscísico (del inglés, abscisic acid)

AON, autorregulación de la nodulación (del inglés, autoregulación of nodulación)

Avr, avirulencia (del inglés, avirulence)

CCaMK, proteína quinasa dependiente de calcio-calmodulina (del inglés, calcium calmodulin-dependent protein kinase)

CDPK, proteína quinasa dependiente de calcio (del inglés, calcium-dependent protein kinase)

CPF, factor de corte y poliadenilación (del inglés, cleavage and polyadenylation factor)

CRT, calreticulina (del inglés, calreticulin)

DAMP, patrones moleculares asociados al daño (del inglés, damage-associated molecular patterns)

ENOD, nodulina temprana (del inglés, early nodulin)

EPS, exopolisacáridos

ET, etileno

ETI, inmunidad activada por efector (del inglés, eaffector-triggered immunity)

ETS, susceptibilidad activada por efector (del inglés, eaffector-triggered susceptibility)

GC, glucanos cíclicos

HH103, *S. fredii* HH103

HR, respuesta hipersensible (del inglés, hypersensite response)

HSP, proteína de choque térmico (del inglés, heat shock protein)

IPTG, Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

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

JA-ile, ácido jasmónico-isoleucina (del inglés, jasmonic acid-isolecine)

JA, ácido jasmónico (del inglés, jasmonic acid)

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

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

LPS, lipopolisacárido (del inglés, lipopolysaccharide)s)

LRR, dominio de repetición rico en leucina (del inglés, leucine-rich repeat)

LysM, motivo de lisina (del inglés, lysin motif)

MAP, proteínas activadas por mitógenos (del inglés, mitogen-activated protein)

MAPK, proteínas quinasas activadas por mitógenos (del inglés, mitogen-activated protein kinase/s)

MAMP, patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés, pathogen-associated molecular patterns)

MDA, malondihaldehído (malondihaldehído)

MeJA, metil jasmonato (del inglés, methyl jasmonate)

MeSA, ácido metil salicílico (del inglés, methyl salicylic acid)

MTI, inmunidad activada por microbio (del inglés, microbial-triggered immunity)

NEL, tipo de ligasa E3 (del inglés, novel E3 ligase)

NGR234, *S. fredii* NGR234

NIN: gen relacionado con el desarrollo del proceso de nodulación (del inglés, nodule inception)

NO, óxido nítrico (del inglés, nitric oxide)

Nod, nodulación (del inglés, nodulation)

Nop, proteínas translocadas a través de la membrana externa vía sistema de secreción de tipo 3 (del inglés, nodulation outer protein)

NLS, señal de localización nuclear (del inglés, nuclear localization signal)

rhc, genes conservados de rizobios (del inglés, rhizobium conserved)

PAMP, patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés, pathogen-associated molecular patterns)

PGPR, rizobacterias de promoción del crecimiento vegetal (del inglés, plant growth promoting rhizobacteria)

PI: fosfatidilinositol (del inglés, phosphatidylinositol)

PR, relacionado con la patogenicidad (del inglés, pathogenicity related)

Proteínas R, proteínas de resistencia (del inglés, resistance proteins)

PRR, receptores de reconocimiento de patrones (del inglés, pattern recognition receptors)

RE, retículo endoplasmático

RK, receptor quinasa (del inglés, receptor kinase)

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

SA, ácido salicílico (del inglés, salicylic acid)

SAR, resistencia sistémica adquirida (del inglés, systemic acquired resistance)

SL, hace referencia a las interacciones sintéticas letales en levaduras (del inglés, synthetic lethality)

SOD, superóxido dismutasa (del inglés, superoxide dismutase)

Tat, translocación doble arginina (del inglés, twin-arginine translocation)

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

USDA257, *S. fredii* USDA257

Introducción

1. La simbiosis *Rhizobium*–Leguminosa.

Las plantas y los animales viven en un mundo microbiano. Esta convivencia propicia el desarrollo de un gran número de relaciones de diversa naturaleza, ya sea con microorganismos patógenos o beneficiosos. La simbiosis es la relación más estrecha que se conoce y se caracteriza por repercutir de forma positiva tanto para la bacteria como para su organismo hospedador. La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es una relación de mutualismo facultativo y se da entre los microorganismos denominados rizobios y las plantas leguminosas (o no leguminosas del género *Parasponia*). Esta relación es particularmente importante debido a que aumenta la disponibilidad de nitrógeno para la planta, permitiendo su crecimiento y desarrollo, por lo que es de gran importancia agronómica y económica al aumentar el rendimiento de los cultivos de las leguminosas comerciales. Durante la simbiosis el rizobio reduce el nitrógeno molecular de origen atmosférico hasta amonio mediante el proceso denominado fijación biológica del nitrógeno, dando lugar a formas de nitrógeno disponibles para la planta. Al mismo tiempo, la bacteria se sirve de una fuente de carbono y energía de origen vegetal y es albergada en un órgano específico llamado nódulo que se forma en la planta a través de un proceso complejo denominado nodulación. El término rizobio engloba a una gran diversidad de bacterias Gram-negativas, pertenecientes a los grupos α y β -*proteobacteria*. Dentro de sus leguminosas hospedadoras se encuentran un gran número de plantas de interés comercial, como son las especies de la Familia *Fabaceae* (o *Leguminosae*), que incluye las subfamilias *Papilionoideae* (o *Faboideae*), *Mimosoideae* y *Caesalpinioideae*, con 14.000, 3.270 y 2.000 especies, respectivamente. El género *Ensifer* (*Sinorhizobium*) (Willem, 2006) presenta una amplia distribución geográfica y constituye el género de rizobios que nodula un mayor número de leguminosas (en esta Tesis se hará referencia únicamente al género *Sinorhizobium*, y no a *Ensifer*, debido a motivos históricos exclusivamente). Dentro de este género existen distintas especies, como *S. teranga*, *S. americanum*, *S. saheli*, *S. arboris*, *S. meliloti* o *S. fredii*, siendo las dos últimas las más relevantes. De entre todas las estirpes de *Sinorhizobium fredii* estudiadas hasta la fecha, la estirpe HH103, aislada por Dowdle y Bohlool en 1985 en la región central de China, es capaz de nodular una gran variedad de cultivares de soja, incluyendo cultivares americanos y asiáticos. Sin embargo, NGR234, que presenta el mayor rango de nodulación conocido (nodula al menos 112 géneros de leguminosas), no

nodula esta planta. Por otro lado, la estirpe USDA257 es capaz de nodular al menos 79 géneros y 135 especies de leguminosas (**Pueppke y Broughton, 1999**) pero, curiosamente, induce nódulos fijadores de nitrógeno sólo en las variedades de soja asiáticas pero no en las americanas o genéticamente mejoradas.

Descripción del proceso de nodulación.

Cuando el nivel de nitrógeno limita el crecimiento de la planta se establece una relación simbiótica entre los rizobios y las plantas leguminosas. La interacción comienza con un diálogo molecular entre los dos miembros de la simbiosis, que conlleva la expresión coordinada de un gran número de genes (**D’Haeze y Holsters, 2002; Kondorosi et al., 2013; Patriarca et al., 2004**). El diálogo molecular comienza con la exudación por la raíz de la planta de una serie de moléculas de naturaleza polifenólica y solubles en agua, los flavonoides. Los flavonoides se secretan en bajas cantidades y de manera continua por las raíces, pero su concentración aumenta en la rizosfera si en ésta existen rizobios compatibles con la leguminosa (**Broughton et al., 2000**). Cada planta secreta una determinada mezcla de estas moléculas e inducen en el rizobio compatible la expresión de los genes de nodulación. Estos genes están presentes generalmente en un plásmido, denominado plásmido simbótico o pSym, y son los encargados de la síntesis de una serie moléculas señal de la familia de los lipo-quitooligosacáridos (LCO), también llamados factores Nod. La estructura general de los LCO está constituida por entre 3 y 6 moléculas de *N*-acetil-glucosamina, presentando un ácido graso en su extremo no reductor. Esta estructura básica puede contener una serie de sustituciones o decoraciones de diferente naturaleza que varían en los distintos rizobios, de forma que cada uno de ellos produce y secreta una determinada familia de factores Nod que actúan de modo cooperativo, determinando el conjunto de leguminosas que éstos pueden nodular (**Minami et al., 1996; Oldroyd, 2013**). Además, estas moléculas activan en la planta la vía temprana de señalización mediada por factores Nod cuando son reconocidos por receptores específicos de la planta hospedadora (**Marsh et al., 2007**). Junto con los factores Nod, el reconocimiento inicial del rizobio por parte de la planta se produce a través de ciertas moléculas superficiales, como los polisacáridos, lo que permite la entrada de la bacteria al interior de las células de la raíz y es crucial para el desarrollo del nódulo fijador (**Downie, 2010; Long y Ehrhardt, 1989**). Los polisacáridos más importantes, en cuanto a su relevancia

simbiótica se refiere, son los β -glucanos cíclicos (GC), los lipopolisacáridos (LPS), los exopolisacáridos (EPS) y los polisacáridos capsulares tipo antígeno-K (KPS) (Frayse *et al.*, 2003; Gage, 2004).

Parece ser que la vía ancestral de entrada de los rizobios al interior de la raíz se producía a través de heridas o por las roturas del tejido epidérmico producidas por la emergencia de las raíces laterales (la denominada entrada por rotura o *crack entry*, en inglés), proceso que se da en leguminosas de climas subtropicales como *Arachis*, *Aeschynomene* y *Stylosanthes* (Boogerd y van Rossum, 1997; Giraud, 2007; Oldroyd y Downie 2004) (Figura 1). Este mecanismo consiste básicamente en la colonización del “bolsillo” intracelular, generado por la muerte celular localizada en la zona de infección, y parece ser funcionalmente similar al mediado por factores Nod (Oldroyd *et al.*, 2011). Como producto del proceso evolutivo, se ha producido una vía de entrada más sofisticada, que implica la comunicación entre ambos miembros de la simbiosis y la biosíntesis y secreción de los factores Nod, y que se da en la mayor parte de las relaciones simbióticas entre los rizobios y las leguminosas (Figura 1). En este caso, la formación del nódulo ocurre tras la interacción coordinada entre el proceso de infección del rizobio y el proceso de organogénesis del nódulo inducido en la planta (Suzaki y Kawaguchi, 2014). Los rizobios se adhieren a la punta de los pelos radicales en desarrollo a través de una serie de moléculas específicas, tanto del rizobio como de su hospedador, induciendo la curvatura del pelo radical (proceso dependiente de calcio) que hace que se forme una estructura similar a la de un cayado de pastor, quedando los rizobios en el interior del “bolsillo” que se genera (Geurts y Bisseling, 2002). Es por este “bolsillo” por el que las bacterias se introducen en la célula eucariota, mediante un proceso de invaginación de la membrana plasmática en el que, previamente, se produce la rotura local de la pared celular. Esto resulta en la formación de una estructura tubular en las células epidérmicas de la raíz denominada tubo de infección, que crecerá en dirección a las células del córtex y transportará gran cantidad de bacterias en división, proceso que no sólo depende de los factores Nod, sino también de los GC y del EPS (Figura 1) (Jones *et al.*, 2007; Kondorosi *et al.*, 2013).

Paralelamente a la formación del tubo de infección, se produce la activación del ciclo celular de las células corticales, proceso que depende de la modulación del balance de las hormonas del crecimiento vegetal (auxina y citoquinina) y que se produce como consecuencia del reconocimiento de los factores Nod bacterianos por receptores de la

planta. De hecho, la simple adición de los factores Nod producidos por el rizobio compatible, sin la presencia de la bacteria, es capaz de inducir la organogénesis nodular originando un primordio nodular. Este reconocimiento desencadena la activación de varios mecanismos, entre los que se encuentra el aumento de calcio en el citoplasma y el núcleo de las células de la raíz. Por otro lado, los altos niveles de calcio provocan la activación de una proteína quinasa dependiente de calcio-calmodulina CCaMK (del inglés, Calcium Calmodulin-dependent protein Kinase), que conlleva a la activación de diversos genes, entre los que se encuentran los genes *NIN* y *ENOD*, lo que promueve la iniciación del programa de desarrollo nodular (**Figura 1**) (**Gleason et al., 2006; Miller et al., 2013; Shimoda et al., 2012**). Además, este tipo de quinasas se encuentran involucradas en las respuestas a patógenos y a daños mecánicos (**Evangelisti et al., 2014**). La división de las células del córtex culmina con la formación del primordio nodular, que es finalmente alcanzado por el tubo de infección que comienza a ramificarse y a extenderse. Una vez allí, las bacterias son liberadas al interior de las células vegetales mediante un proceso de endocitosis, por el que los rizobios se diferencian hasta bacteroides. Estos bacteroides se multiplican y se rodean, bien individualmente o en pequeños grupos, de una membrana de origen vegetal llamada membrana peribacteroidea, importante para el intercambio de metabolitos entre la célula vegetal y la bacteria, dando lugar a los denominados simbiosomas. En su última etapa de desarrollo, los bacteroides dejan de dividirse y se diferencian hasta bacteroides maduros, capaces de reducir el nitrógeno atmosférico a amonio por la acción del complejo enzimático denominado nitrogenasa (**Figura 1**).

La excesiva formación de nódulos interfiere con el desarrollo de la planta, por lo que las leguminosas controlan el número y la masa de los nódulos a través del mayor sistema de autorregulación por retroalimentación negativa que se conoce en plantas. Este proceso se denomina autorregulación de la nodulación (AON, del inglés, Autoregulation Of Nodulation) (**Kosslak y Bohloul, 1984; Soyano et al., 2014**).

La forma y la anatomía del nódulo dependen exclusivamente de la planta y tiene relación con la posición taxonómica (**Sprent, 2007**). Existen dos tipos de nódulos: indeterminados, habitualmente presentes en leguminosas de climas templados, como *Sophora tomentosa*, *Medicago sativa* o *Pisum sativum*, y determinados, habitualmente característicos de leguminosas (sub) tropicales, como los desarrollados por *Glycine max*, *Lotus japonicus* y *Vigna unguiculata*. En los nódulos indeterminados el primordio se

origina en el córtex interno de la raíz y da lugar a un meristemo apical persistente, de modo que continuamente se generan nuevas células que van siendo infectadas, por lo que el nódulo adopta una forma cilíndrica. El primordio de los nódulos determinados se origina en el córtex externo y da lugar a un meristemo cuya actividad es transitoria, de modo que genera una masa esférica de células que se diferenciarán simultáneamente (**Figura 1**).

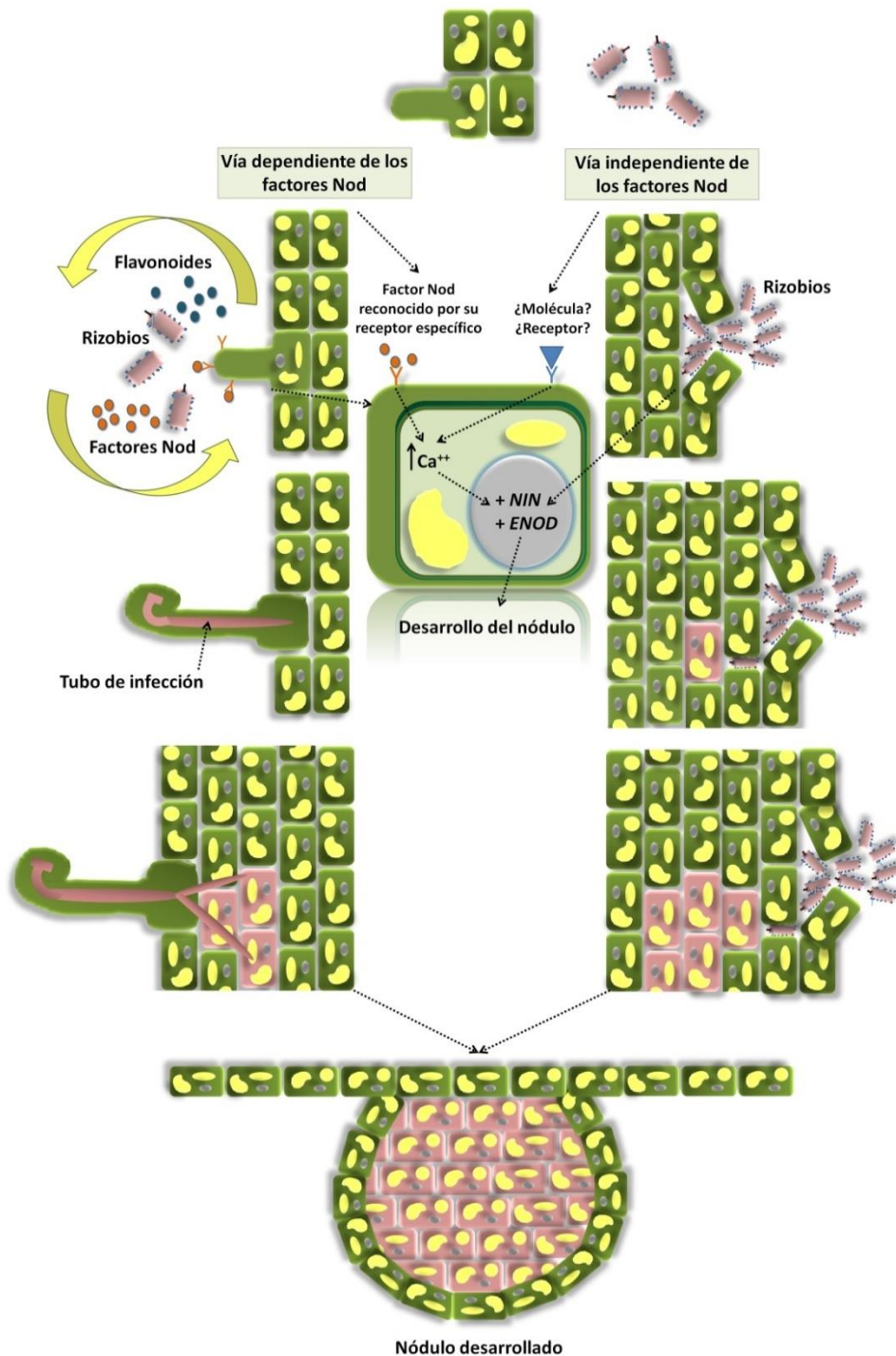


Figura 1. Proceso de nodulación a través de la vía dependiente e independiente de los factores Nod.

2. Sistemas de secreción de proteínas en bacterias Gram-negativas.

Muchas bacterias Gram-negativas son capaces de secretar proteínas a través de la membrana externa mediante diversas estructuras denominadas sistemas de secreción. Hasta la fecha se han identificado nueve sistemas de secreción diferentes, T1SS-T9SS, del inglés Type (1-9) Secretion System (Desvaux *et al.*, 2009; Glew *et al.*, 2012) y se clasifican según la naturaleza molecular de la maquinaria de transporte y las reacciones que catalizan (Lee y Schneewind, 2001) (Figuras 2 y 3). Estos sistemas traslocan las proteínas directamente desde el citosol al exterior celular. Sin embargo, muchos de ellos dependen de otros sistemas (Sec y/o Tat), cuya función es translocar las proteínas desde el citosol al espacio periplásmico.

El sistema Sec está compuesto por un conjunto de proteínas denominado traslocón, en el que la fuente de energía es el ATP. La proteína secretada a través de este sistema, a veces referida como pre-proteína por su estructura no plegada, contiene una secuencia señal en el extremo amino terminal que es eliminada por peptidasas cuando se trasloca (Ito y Mori, 2009; Papanikou *et al.*, 2007). El sistema Tat, sin embargo, no está tan conservado como el anterior y se sirve del gradiente de protones como fuente de energía (Bogsch *et al.*, 1998; Cline *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 2000). Además, las proteínas que lo atraviesan se encuentran ya plegadas y presentan un motivo de doble arginina en su secuencia (Berks, 1996; Hynds *et al.*, 1998). Entre los sistemas de secreción que traslocan proteínas a través de la membrana externa bacteriana se encuentran aquellos que liberan las proteínas al medio extracelular (T1SS, T2SS y T5SS), los que inyectan las proteínas al interior del citoplasma de las células de un hospedador eucariota (T3SS, T4SS y T6SS), o al de bacterias (T6SS), y otros que se requieren para la biosíntesis de apéndices en la superficie de la bacteria (T7SS, T8SS y T9SS) (Desvaux *et al.*, 2009; Glew *et al.*, 2012). Los sistemas T1SS, T3SS, T4SS, T6SS y T9SS se componen de un conjunto de proteínas que atraviesan las membranas interna y externa de la bacteria, promoviendo la secreción de las proteínas en un solo paso (Rego *et al.*, 2010). Sin embargo, los sistemas T2SS, T5SS, T7SS y T8SS solo forman un canal en la membrana externa y son dependientes del sistema Sec. Además, el T2SS también puede secretar proteínas provenientes de la translocación mediante el complejo Tat (Dautin y Bernstein, 2007).

A través de estos sistemas se traslocan moléculas de diversa naturaleza protéica, como proteasas, toxinas, lipasas, enzimas hidrolíticas; o no protéica, como ácidos

nucleicos (solo mediado por el T4SS), entre otras (Lee y Schneewind, 2001; Thanassi y Hultgren, 2000).

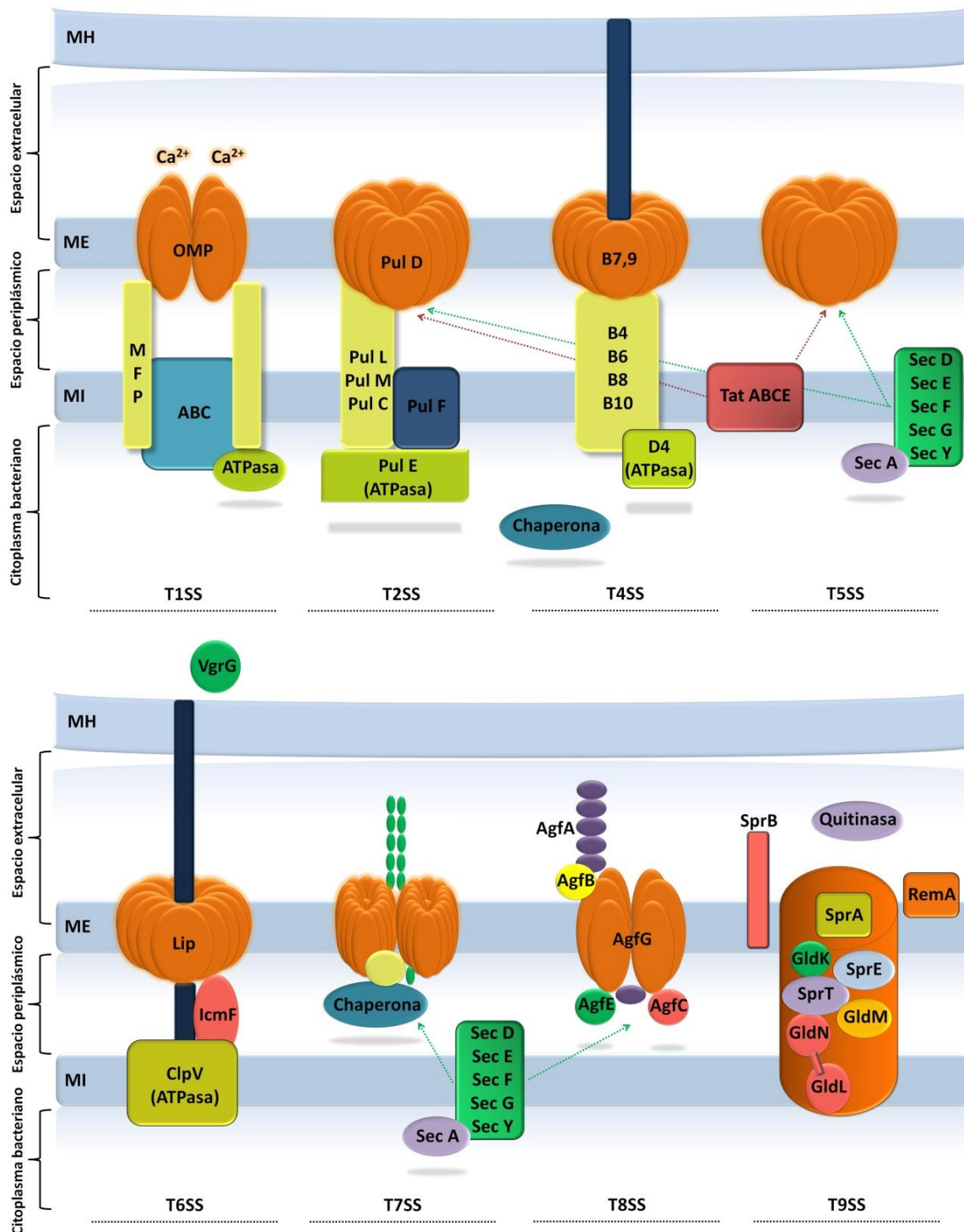


Figura 2. Sistemas de secreción de las bacterias Gram-negativas. **MH**, Membrana del hospedador. **ME**, Membrana externa bacteriana. **MI**, Membrana interna bacteriana.

2. 1. El sistema de secreción de tipo 3 (T3SS).

Una gran diversidad de bacterias Gram-negativas utilizan el T3SS para inyectar proteínas, denominadas efectores, directamente al interior de la célula hospedadora. Una vez dentro de la célula hospedadora, estas proteínas ejercen diferentes funciones que repercutirán en el propio beneficio de la bacteria (Galán *et al.*, 2014). El T3SS se encuentra muy extendido en la naturaleza y lo poseen un gran número de microorganismos. Se ha estudiado en patógenos de animales, como *Yersinia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli* enteropatógenas (EPEC) o enterohemorrágicas (EHEC), *Pseudomonas aeruginosa* o *Chlamydia* spp. (Cornelis *et al.*, 1998; Frankel *et al.*, 1998; Galan y Collmer, 1999; Kalman *et al.*, 2000; Van Nhieu *et al.*, 1997). Además, se encuentra en la mayoría de las bacterias Gram-negativas patógenas de plantas, como *Erwinia amylovora*, *P. syringae*, *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas* spp. (Alfano y Collmer, 1997; Galan y Collmer, 1999) y patógenas de hongos, como *P. fluorescens* NZI7 (Burlinson *et al.*, 2008). Sin embargo, el T3SS no es exclusivo de bacterias patógenas. La secuenciación de multitud de genomas ha facilitado la identificación del T3SS en bacterias que establecen relaciones simbióticas con vertebrados, plantas e insectos (Buttner y He, 2009; Correa *et al.*, 2012; Silver *et al.*, 2007). En los rizobios, el T3SS está presente sólo en algunas especies y aún no se ha podido establecer ninguna correlación entre el género del rizobio y la presencia del T3SS. Aunque las proteínas que conforman la estructura de la maquinaria de este sistema se encuentran muy conservadas entre estos microorganismos, los efectores que son inyectados a través de él son específicos de cada microorganismo, ya sea patógeno o simbiote (Galán, 2009).

Los análisis filogenéticos indican que el T3SS deriva de un proceso evolutivo de exaptación a partir del flagelo bacteriano, es decir, una adaptación del flagelo a una funcionalidad nueva y diferente a la que tenía (Pallen *et al.*, 2005). Al parecer, este proceso evolutivo constó de dos fases (Abby y Rocha, 2012). La primera fue el establecimiento de una estructura que permitía la secreción de proteínas que sólo era capaz de llevar a cabo funciones de movilidad. La segunda se produjo cuando este flagelo modificado reclutó proteínas del tipo de las secretinas, que fueron responsables de controlar la secreción de ciertas proteínas a través de este sistema. Las secretinas, presentes en las bacterias Gram-negativas, incluyen proteínas de la membrana externa involucradas en el reconocimiento de fagos o en la secreción de proteínas. Finalmente,

surgió el T3SS, que supone uno de los mayores complejos proteicos de secreción conocidos hasta el momento. No se conoce cómo las bacterias simbióticas adquirieron el T3SS, pero se plantea la hipótesis de que se debe a la transferencia horizontal de material genético a partir de las bacterias patógenas (Nguyen *et al.*, 2000).

El descubrimiento de la existencia de un T3SS funcional en los rizobios se realizó a partir de la secuenciación del plásmido pNGR234a de *S. fredii* NGR234 por Viprey *et al.* (1998). La posterior secuenciación de los genomas y de los plásmidos de distintas especies de rizobios ha puesto en evidencia la presencia del T3SS en muchas, pero no en todas, las especies estudiadas. Hasta la fecha, el T3SS funcional se ha identificado, entre otras, en las estirpes HH103, USDA257 y NGR234 de *S. fredii*, en la estirpe USDA110 de *Bradyrhizobium diazoefficiens* (antes denominado *B. japonicum* y referida en esta Tesis como tal, Delamuta *et al.*, 2013), en la estirpe MAFF303099 de *Mesorhizobium loti* y en *B. elkanii* USDA61 (de Lyra *et al.*, 2006; Göttfert *et al.*, 2001; Kaneko *et al.*, 2000, 2002; Krause *et al.*, 2002; Krishnan *et al.*, 2003; Okazaki *et al.*, 2010; Viprey *et al.*, 1998). De forma similar a lo que ocurre en las bacterias fitopatógenas, los genes del T3SS de los rizobios se encuentran localizados en regiones de entre 30 y 47 kb, denominadas islas simbióticas. Éstas se localizan en el cromosoma o en los plásmidos simbióticos (pSym), donde también se encuentran los genes de nodulación y de fijación de nitrógeno (de Lyra *et al.*, 2006; Freiberg *et al.*, 1997; Göttfert *et al.*, 2001; Kaneko *et al.*, 2000; Krishnan *et al.*, 2003; Marie *et al.*, 2001; Viprey *et al.*, 1998). En los rizobios, el conjunto de los genes del T3SS recibe el nombre de región *tts* (del inglés, *type three secretion*) (Troisfontaines y Cornelis, 2005). Los genes estructurales del T3SS de los rizobios se denominan *rhc*, del inglés, *rhizobium conserved*, mientras que las proteínas secretadas a través de éste reciben el nombre de Nop, del inglés *Nodulation outer protein* (Marie *et al.*, 2001; Viprey *et al.*, 1998). La región *tts* de las estirpes NGR234, USDA257 y HH103 de *S. fredii* presenta una organización idéntica y las secuencias de nucleótidos, tanto de los genes como de las secuencias intergénicas, se encuentran altamente conservadas (98-99%), mientras que las secuencias proteicas presentan un rango de similitud de entre el 94 y el 100%. Sin embargo, la correspondiente similitud en las secuencias proteicas con las estirpes *M. loti* MAFF303099 y *B. diazoefficiens* USDA110 se encuentra entre el 63-95% y el 41-83%, respectivamente (Tampakaki, 2014).

En los rizobios, como ocurre en muchas bacterias fitopatógenas, se han identificado diferentes T3SS no canónicos, que se corresponden con aquellos que carecen de algún elemento estructural y/o regulador y cuya interacción con la planta se desconoce. Un caso muy peculiar es el T3SS de *B. elkanii* USDA61, ya que su T3SS posee una organización, regulación y función muy diferente del resto de los rizobios (**Tampakaki, 2014**).

2. 2. Estructura del T3SS.

De forma general, el T3SS se diferencia en dos partes (**Figura 3**): i) una base cilíndrica, similar al cuerpo basal del flagelo, que atraviesa las dos membranas bacterianas y que asegura la estabilidad de toda la estructura sobre la cubierta celular; ii) una estructura extracelular alargada y hueca denominada aguja o *needle* en patógenos de animales, *pilus* Hrp en fitopatógenos y apéndice extracelular, similar al *pilus*, en los rizobios. Estos apéndices extracelulares poseen diferentes características: el *pilus* es una estructura flexible, delgada y alargada, mientras que la aguja es rígida y más corta. Ambas estructuras están físicamente unidas al cuerpo basal y se asume que ejercen funciones análogas.

La estructura del T3SS se identificó por primera vez en *S. typhimurium* (**Kubori et al., 1998**) y se ha comprobado que la mayor parte de los componentes están muy conservados entre los microorganismos que lo poseen. Las dimensiones de la base de *S. typhimurium* son de aproximadamente 25 nm de ancho y 30 nm de largo y está compuesta por dos anillos asociados a la membrana interna, que se conectan con dos anillos externos, que se asocian a la membrana externa a través del cuello. Los anillos internos se encuentran formados por dos proteínas: PrgK/PrgH, en *Salmonella* spp., o HrcJ/HrpQ en *Pseudomonas* spp. En los rizobios, hasta ahora sólo se ha identificado la proteína RhcJ como componente de los anillos internos. Por otra parte, los anillos externos y el cuello del T3SS de patógenos están compuestos por una sola proteína, InvG, en *Salmonella* spp., HrcC en *Pseudomonas* spp., y por dos proteínas, RhcC1 y RhcC2, en los rizobios (**Figura 3**). Además, el T3SS de todos los organismos posee un grupo de cinco proteínas conservadas de la membrana interna, localizado en el centro de los anillos internos y que podría actuar como un canal para facilitar el paso de las proteínas secretadas a través de la membrana interna: InvA/SpaP/SpaQ/SpaR/SpaS, en *Salmonella* spp., HrcV/HrcR/HrcS/HrcT/HrcU en *Pseudomonas* spp. y

RhcV/RhcR/RhcS/RhcT/RhcU en los rizobios (**Figura 3**). Aunque normalmente se considera como un conjunto de proteínas, se piensa que cada una de ellas ejerce una función especializada (**Galán et al., 1992; Wagner et al., 2010**). Existen numerosas proteínas citosólicas muy conservadas entre los distintos T3SS, esenciales para la secreción, y que se encuentran unidas a la cara citoplasmática del sistema. Estas proteínas, posiblemente, conforman una estructura definida, como ocurre con el anillo C de la estructura flagelar, cuya función se relaciona con en el cambio de dirección de la rotación del flagelo (**Abrusci et al., 2013; Driks y DeRosier, 1990**). Sin embargo, no existen evidencias de que una estructura similar forme parte del T3SS. Otro de los componentes citosólicos del T3SS altamente conservado es una ATPasa, encargada del reconocimiento y desplegamiento de la proteína sustrato (InvC, HrcN y RhcN, en *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp. y los rizobios, respectivamente) (**Galán et al., 2014**) (**Figura 3**).

La aguja de *S. typhimurium* mide aproximadamente 50 nm de largo y el *pilus* Hrp de *P. syringae* puede alcanzar más de 2 μm (**Tampakaki, 2014**). Este apéndice se encuentra anclado a la base del sistema a través de la varilla interior, que descansa sobre una estructura de anclaje o *socket*, y está formada por una proteína de ~90 aminoácidos (PrgJ y HrpB, en *Salmonella* spp. y *Pseudomonas* spp., respectivamente) (**Figura 3**) (**Lee y Galán, 2004**). El conjunto de estas proteínas conforman un canal por donde son conducidas las proteínas secretadas, cuyo diámetro es de ~20 Å en *Salmonella* spp. (2 nm) y de 6-8 nm en *P. syringae* y en las estirpes de *S. fredii* estudiadas (**Radics et al., 2014; Tampakaki, 2014**). Al igual que el filamento del flagelo, la aguja o el *pilus* es la consecuencia del ensamblaje de múltiples copias de una subunidad: PrgI en *Salmonella* spp., HrpA en *Pseudomonas* spp. y NopA y NopB en los rizobios, dispuestos en forma de α -hélice (**Figura 3**) (**Cordes et al., 2003; Galkin et al., 2010; Kubori et al., 2000; Loquet et al., 2012**). Las proteínas NopA y NopB (**Ausmees et al., 2004; Marie et al., 2004**), de ~6 y ~21 kDa, respectivamente, se encuentran presentes en todos los rizobios que poseen el T3SS y la primera de ellas posee una estructura secundaria deducida similar a la de otras proteínas que son subunidades de los *pili* Hrp, con un posible contenido en α -hélice del 70 al 90% (**Koebnik, 2001**). El uso de anticuerpos específicos anti-NopA y anti-NopB han demostrado que estas dos proteínas son componentes del T3SS-*pilus* y que NopA podría ser el componente mayoritario (**Deakin et al., 2005; Saad et al., 2007**).

En el extremo de la ajuga o el *pilus* puede situarse una única proteína no muy conservada, conformando el complejo del extremo, que podría jugar un papel en el reconocimiento de la célula del hospedador y el despliegue de las proteínas traslocasas (**Epier et al., 2012**). Dependiendo de la estructura de la región amino terminal, las proteínas del extremo se clasifican en dos grupos: familia SipD/IpaD de *Salmonella* spp. y *Shigella* spp., respectivamente, y familia LcrV/PcrV de *Yersinia* spp. y *Pseudomonas* spp., respectivamente (**Galán et al., 2014**) (**Figura 3**). Sin embargo, existen otras variantes, como el T3SS de *E. coli*, que presenta en el extremo de la aguja otro filamento de mayor longitud que la propia aguja, de mayor flexibilidad y formado por una única proteína, y que podría funcionar como un anclaje a la célula hospedadora (**Knutton et al., 1998**).

El último paso en la liberación de los efectores a través del T3SS es la translocación de proteínas bacterianas dentro de la célula eucariota a través de su membrana plasmática. Este paso está mediado por las enzimas traslocasas (SipBC y HrpK de *Salmonella* spp. y *Pseudomonas* spp., respectivamente) que se insertan en la membrana de la célula hospedadora donde, presumiblemente, forman un canal. Aunque estas proteínas no se encuentren muy conservadas a nivel de secuencia, todas ellas son proteínas con estructuras de α -hélices. NopX es una proteína de alrededor de 60 kDa que muestra un 48% de identidad con la proteína traslocadora HrpF de *X.campestris* pv. *vesicatoria* y se piensa que podría estar involucrada en la translocación de proteínas efectoras a través del T3SS rizobiano (**Viprey et al., 1998**) (**Figura 3**). Esta suposición está apoyada, además, por estudios de inmunolocalización de NopX en soja y *Vigna unguiculata*, que indican que NopX se encuentra en los tubos de infección pero no en los nódulos (**Krishnan, 2002**).

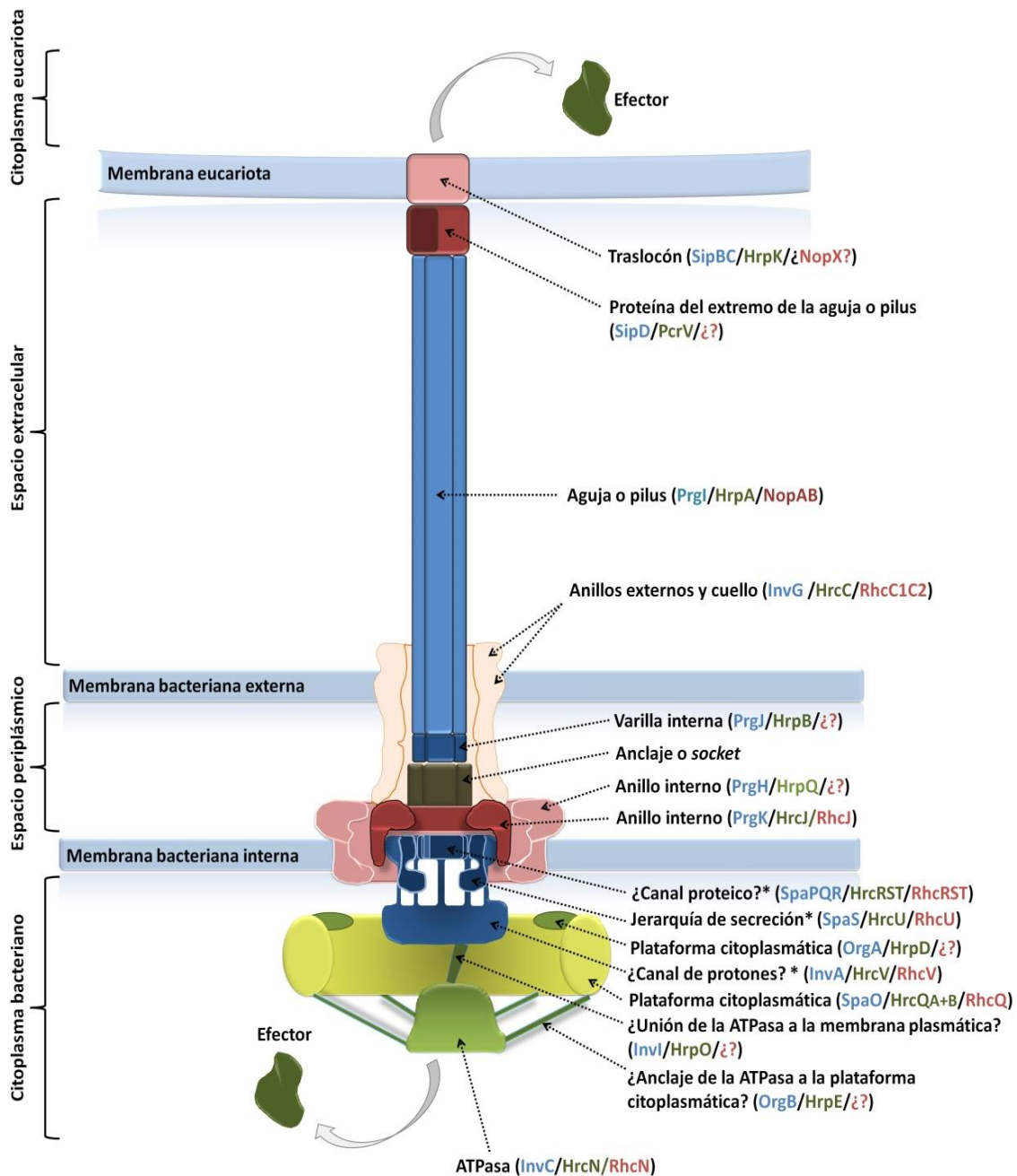


Figura 3. Esquema general de la organización de las proteínas del T3SS. Se indica con una flecha la situación de cada proteína y su posible función. Los asteriscos indican la pertenencia al grupo de proteínas exportadoras de la membrana interna. Entre paréntesis se representan la nomenclatura de las proteínas del T3SS del patógeno animal *S. enterica* (azul) (isla de patogenicidad de *Salmonella* 1 o SPI-1), del fitopatógeno *P. syringae* (verde) y de los rizobios (rojo). Figura modificada a partir de la publicada por Galán *et al.* (2014).

2. 3. Regulación de la actividad del T3SS en los rizobios.

En general, el T3SS requiere una señal activadora previa a la secreción de los efectores a través del sistema, aunque este mecanismo de activación en patógenos se encuentra poco estudiado. En la infección de un hospedador animal por parte de un microorganismo patógeno resulta crucial el contacto entre éstos. De esta forma, el reconocimiento por parte del patógeno desencadena una reprogramación de la maquinaria de transcripción y una consecuente activación coordinada de los genes del T3SS, proceso en el que el complejo proteico situado en la punta del apéndice del T3SS juega un papel importante (**Brencic y Winans, 2005; Francis et al., 2002; Galán et al., 2014**). Los genes del T3SS de bacterias patógenas de plantas se expresan en respuesta a factores ambientales y a la interacción con el organismo hospedador (**Arlat et al., 1992; Rahme et al., 1992; Schulte y Bonas, 1992; Wei et al., 1992; Xiao et al., 1992**). Así, algunos estudios han demostrado que los genes del T3SS del fitopatógeno *Ralstonia solanacearum* se inducen cuando la bacteria entra en contacto con las células de la planta. Sin embargo, en contra de lo que ocurre con los patógenos de animales, esta inducción no depende del *pilus*, sino que está mediada por una proteína de membrana (**Aldon et al., 2000; Marena et al., 1998**).

En los rizobios, la regulación de la activación de los genes del T3SS se encuentra ligada al proceso de la nodulación (**Figura 4**). Como se ha comentado con anterioridad, los genes bacterianos responsables de la biosíntesis y secreción de los factores Nod se denominan genes de nodulación. La expresión de estos genes requiere de la participación de la proteína bacteriana NodD, que se transcribe constitutivamente en los rizobios (**Broughton et al., 2000**). La proteína NodD es un regulador transcripcional perteneciente a la familia LysR de reguladores de la transcripción. Los flavonoides secretados por las raíces de las leguminosas inducen cambios conformacionales en la proteína NodD, de forma que ahora es capaz de unirse a una región de ADN altamente conservada de 49 pb, denominada caja de nodulación o caja *nod*, situada delante de los genes de nodulación, activando su transcripción. La caja *nod* contiene una estructura palindrómica imperfecta (ATC-N9-GAT) que es el sitio de unión de la proteína NodD, una vez activada por los flavonoides (**Fisher et al., 1988; Rostas et al., 1986**). El único gen de la región *tts* que contiene una caja *nod* es el gen *ttsI*, que codifica un regulador transcripcional denominado TtsI. Esta proteína comparte características con los reguladores de unión a ADN de los sistemas de dos componentes. Sin embargo,

presenta una mutación en un aminoácido específico, que en condiciones normales es fosforilado para activar los reguladores de respuesta. Por ello el regulador TtsI se encuentra constitutivamente activo (López-Baena, 2008). NodD1 activado por el flavonoide inductor se une a la caja *nod*, situada en la zona promotora del gen *ttsI*, lo que activa su transcripción. El producto del gen *ttsI* (TtsI) se une posteriormente a las cajas *tts* situadas en las regiones promotoras de los genes del T3SS, activando la transcripción de los genes de la región *tts* (Krause *et al.*, 2002; Marie *et al.*, 2004).

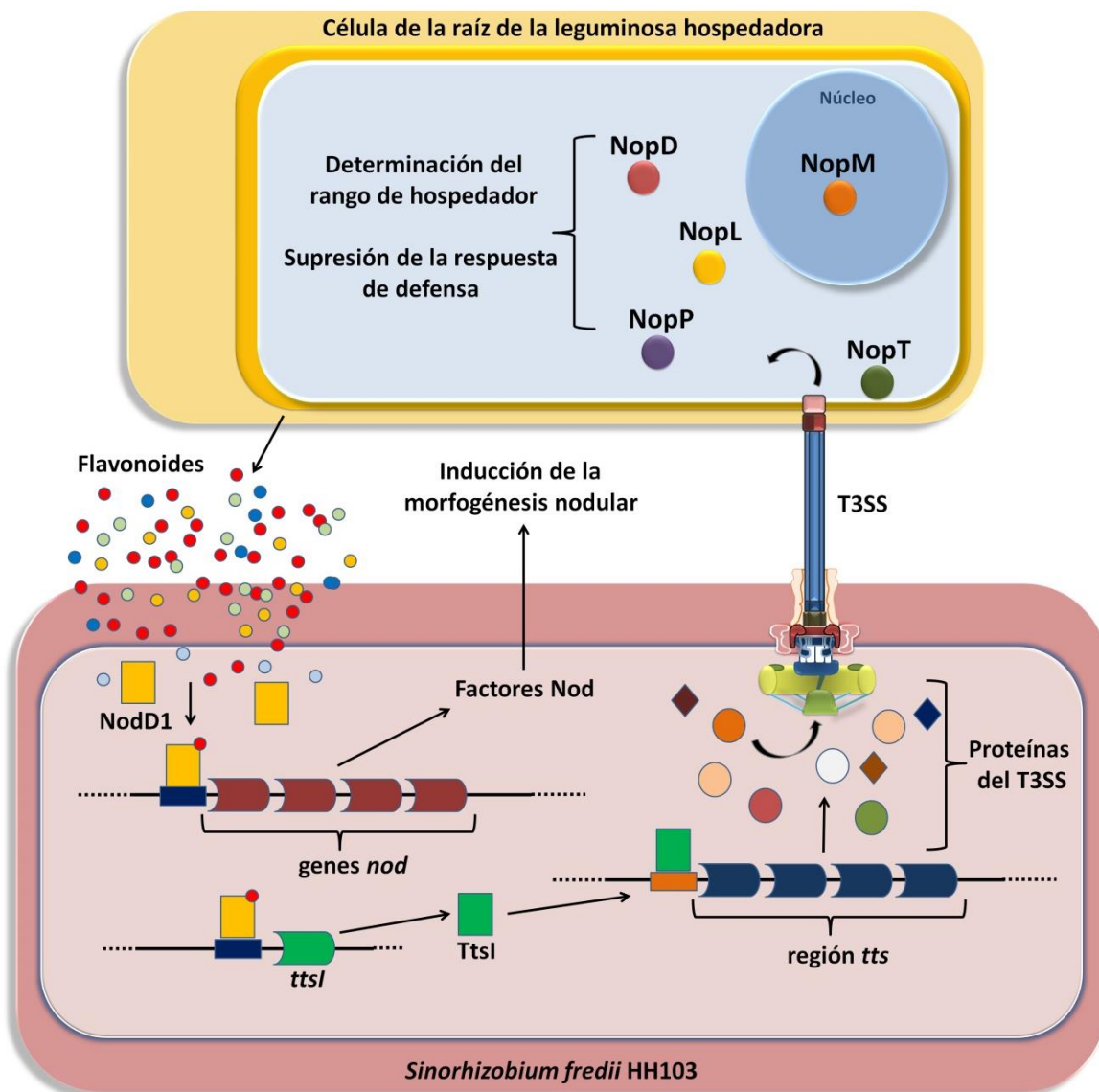


Figura 4. Esquema de la regulación de la secreción de Nops a través del T3SS de *S. fredii* HH103.

Los estudios realizados por de **Lyra et al. (2006)** en la estirpe *S. fredii* HH103 demostraron que el gen *nodA*, tras la inducción con flavonoides, alcanzó su nivel máximo de expresión antes que el gen *rhcJ* (12 horas frente a 20-24 horas). Este nivel máximo de expresión para *nodA* se mantuvo entre las 12 y 24 horas y después declinó. Sin embargo, para *rhcJ*, el nivel de expresión se mantuvo al menos hasta las 40 horas después de la inducción con flavonoides. Todos estos resultados indican que los genes *nod* se expresan antes que los genes de la región *tts* y que estos últimos siguen expresándose, mientras que los genes *nod* se reprimen poco tiempo después de su inducción. En la estirpe NGR234 de *S. fredii*, la mayoría de los genes *nod* se activan inmediatamente después de la inducción con flavonoides y a las 24 horas la expresión de estos genes se detiene y, en cambio, se transcriben los genes de la región *tts* (**Marie et al., 2001**). El patrón temporal de esta expresión indica que la secreción de proteínas coincide con el desarrollo del tubo de infección (**Deakin y Broughton, 2009**) e incluso se han encontrado transcritos de estos genes en nódulos maduros de *Cajanus cajan* y *Vigna unguiculata* (**Perret et al., 1999; Viprey et al., 1998**). Por último, los estudios de transcriptómica descritos en el trabajo de **Zehner et al. (2008)** mostraron que el T3SS de *B. diazoefficiens* USDA110 se encuentra activo tanto en el tubo de infección como en los nódulos en desarrollo de la soja.

Algunas bacterias patógenas poseen dos o más T3SS que actúan en diferentes estadios del proceso de infección. Hasta la fecha, los T3SS múltiples se han encontrado en especies del género *Sinorhizobium*. Las estirpes NGR234, USDA257 y HH103 de *S. fredii* presentan dos T3SS diferentes: el considerado hasta ahora funcional, cuya regulación depende de flavonoides, NodD y TtsI; y el T3SS II, cuya regulación se desconoce y podría jugar un papel importante en otros aspectos de la simbiosis (**Tampakaki, 2014**). Así, estudios recientes han demostrado que los genes del T3SS II de *S. fredii* NGR234 se inducen en los bacterioides de los nódulos desarrollados en *V. unguiculata* (**Li et al., 2013**).

2. 4. Implicación del T3SS de los rizobios en la simbiosis.

La primera evidencia de la implicación del T3SS en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa fue descrita por **Viprey et al. (1998)**. Posteriormente, la secuenciación del plásmido simbiótico de *S. fredii* NGR234 permitió la construcción de mutantes

afectados en genes del T3SS. Así, se obtuvo una estirpe carente de un T3SS funcional y se comprobó que esta mutación afectaba a la simbiosis dependiendo de la leguminosa hospedadora. Estos estudios mostraron que el T3SS no influía sobre la nodulación en algunas plantas (*Vigna unguiculata* y *Leucaena leucocephala*). En cambio, en otras leguminosas, la ausencia de un T3SS funcional resultó en un efecto beneficioso (*Pachyrhizus tuberosus*). Por último, se observó un tercer grupo de plantas hospedadoras en las que la mutación del T3SS causaba un efecto negativo en la nodulación (*Tephrosia vogelii*). La secuenciación de otros genomas rizobianos y la identificación de los genes de la región *tts* en otras estirpes, como HH103 y USDA257 de *S. fredii*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 y *Mesorhizobium 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. Todos 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).

2. 5. Los efectores translocados a través del T3SS.

Los efectores secretados a través del T3SS de los microorganismos patógenos poseen cierta similitud en su estructura modular. Así, la región amino terminal portaría la información sobre la señal de secreción y de translocación (residuos 1 a 50, aproximadamente), la región central determinaría el dominio de unión a las chaperonas, en aquellos efectores que dependen de éstas para la secreción (secuencia entre los residuos 50 y 150), y la región carboxilo terminal definiría la función de cada efector. Además, la señal de secreción albergada en la región amino terminal podría actuar de forma universal, ya que el sustrato del T3SS de un patógeno puede ser identificado por el aparato de secreción de otro patógeno (Anderson *et al.*, 1999; Subtil *et al.*, 2001). Sin embargo, en los rizobios, esta secuencia señal se encuentra pobremente definida y localizada (Ghosh, 2004; He *et al.*, 2004).

Numerosos estudios sobre las actividades bioquímicas desarrolladas por los diferentes efectores de los T3SS han indicado que éstos son dirigidos específicamente a

distintos compartimentos de la célula eucariota (**Tabla 1**). Una de las teorías más plausibles que explica este hecho es que los efectores, al ser translocados a una baja concentración dentro de la célula hospedadora, son dirigidos a compartimentos determinados donde aumentará la concentración efectiva de la proteína, asegurándose así la correcta actuación sobre las proteínas dianas. Para ello, el efector puede servirse de la maquinaria de la célula eucariota o dirigirse mediante las señales de localización que se encuentran en la propia secuencia del efector (**Hicks y Galán, 2013**). El estudio de los mecanismos por los que los efectores se localizan en los distintos compartimentos ha desvelado la existencia de multitud de ellos.

Una de estas vías es la localización de algunos efectores en la membrana plasmática a través de un proceso de lipidación usando la maquinaria del hospedador. Este proceso consiste en que, una vez que el efector es translocado al interior de citosol de la célula eucariota, es modificado covalentemente mediante la adición de una variedad de grupos lipídicos procedentes de la célula eucariota, lo que incrementa la hidrofobicidad de las proteínas y facilita la inserción del efector en la membrana y la interacción con proteínas específicas (**Hicks y Galán, 2013**). Las células eucariotas realizan este proceso de forma convencional sobre multitud de proteínas a través de distintos procesos de lipidación, como son la S-palmitoilación, N-miristoilación y la prenilación. La S-palmitoilación es un proceso reversible y juega un papel importante en la regulación de la actividad y estabilidad de las proteínas y en las interacciones entre éstas. Se caracteriza por la adición de un ácido palmítico saturado de 16 carbonos mediante una unión tioéster sobre una cisteína específica de la proteína eucariota diana del proceso o del efector procariota, como ocurre con SspH2 y SseI de *Salmonella enterica* (**Tabla 1**) (**Hicks et al., 2011; Linder et al., 2007; Resh, 2006; Smotrýs y Linder, 2004**). La N-miristoilación es necesaria, pero no suficiente, para promover la estabilidad y la asociación permanente de las proteínas con la membrana plasmática, por lo que, frecuentemente, se da junto al proceso de S-palmitoilación. Este proceso consiste en la unión covalente de un ácido mirístico de 14 carbonos (a través de una unión amida, mediante una N-miristoiltransferasa) principalmente a un grupo α -amino de una glicina aminio terminal de la proteína diana eucariota (o efector procariota) que presenta una secuencia consenso en la región amino terminal. Este proceso es uno de los mecanismos por los que muchos de los efectores de *P. syringae*, como AvrPphB (homólogo al efector NopT de los rizobios), se insertan en la membrana plasmática

eucariota (**Tabla 1**) (**Block y Alfano, 2011; Farazi et al., 2001; Feng y Zhou, 2012; Lewis et al., 2008; Nimchuk et al., 2000; Robert-Seilaniantz et al., 2006; Towler et al., 1987**). La prenilación es una modificación postraduccional permanente que consiste en una unión covalente de un grupo farnesil (15 carbonos) o geranil-geranil (20 carbonos) isoprenoide a una cisteína situada dentro de un motivo conservado de la región amino terminal, lo que le aporta estabilidad a las proteínas (**Zhang y Casey, 1996**). Existen evidencias acerca de esta modificación sobre el efector SifA de *S. enterica* (**Tabla 1**) (**Hicks y Galán, 2013**).

Otros efectores del T3SS pueden dirigirse a la membrana plasmática de la célula eucariota a través del proceso denominado ubiquitinación o por la unión a fosfolípidos de las membranas. El primero de ellos consiste en la unión covalente de una o más moléculas de ubiquitina a una lisina de la proteína eucariota, como también ocurre con el efector SopB de *S. enterica* (**Tabla 1**). Este mecanismo puede ser una señal para la degradación de proteínas por la vía dependiente del proteosoma, pero también puede modular las funciones de éstas, por ejemplo, cambiando la localización o promoviendo la formación de complejos multiproteicos (**Haglund y Dikic, 2005; Hicke y Dunn, 2003; Huang et al., 2006; Kerscher et al., 2006; Patel y Galán, 2006; Thrower et al., 2000; Xu et al., 2009**). Los fosfoinosítidos o inositol fosfatos juegan un papel fundamental en la regulación de una gran variedad de procesos celulares, desde el tráfico de membrana hasta la dinámica de la actina. Existen diferentes especies de fosfoinosítidos, generados mediante la fosforilación de grupos inositol de estos fosfoinosítidos en diversas posiciones. Todos ellos están concentrados en distintas membranas intracelulares donde actúan como anclaje de una gran variedad de proteínas. Algunos efectores, como ExoU de *P. aeruginosa*, son ejemplo de efectores que se sirven de la unión a los fosfoinosítidos para poder llegar a su destino, que en este caso es la membrana plasmática (**Tabla 1**) (**Gendrin et al., 2012; Rabin et al., 2006**).

Además, los efectores también pueden dirigirse a otros orgánulos, como a la mitocondria o a los cloroplastos. En la célula eucariota, la mayor parte de las proteínas del cloroplasto y la mitocondria se sintetizan en el citosol como “pre-secuencias”, ya que se encuentran de forma no plegada. En la región amino terminal de esta “pre-secuencia” existe una secuencia señal que forma una α -hélice anfipática, presentando residuos con carga positiva a un lado de la hélice y residuos hidrofóbicos en el otro. Numerosos efectores secretados a través del T3SS de *P. syringae* presentan en su

secuencia amino terminal una composición de aminoácidos similar a las de las proteínas eucariotas, también denominadas “pre-secuencias” (**Tabla 1**).

El núcleo de la célula eucariota supone otro destino para algunos de los efectores secretados a través de este sistema. La mayoría de las proteínas se dirigen desde el citoplasma eucariota hasta el núcleo de la célula viajando a través de los complejos del poro nuclear, formados por grandes estructuras en forma de poro que permiten el paso de proteínas cuyo tamaño no debe exceder los 50 kDa. Para la entrada en el núcleo de proteínas de mayor tamaño se requiere la presencia, en su secuencia, de la señal de localización nuclear (NLS, del inglés, Nuclear Localization Signal). La señal clásica consta de una o dos secuencias de aminoácidos cortas y ricas en los aminoácidos lisina y arginina, con cargas positivas y que son reconocidas por transportadores solubles de las superfamilias α y β importina de la célula eucariota (**Mattaj y Englmeier, 1998**). Muchos efectores presentan estas secuencias señales, como los activadores de la transcripción de las bacterias del género *Xanthomonas*, que se localizan en el núcleo para regular la expresión de los genes de la planta durante la infección (**Tabla 1**) (**Bogdanove et al., 2010**).

Tabla 1. Función, dianas, localización y mecanismo de orientación (usado para situarse en el orgánulo) de los efectores identificados en algunos géneros de bacterias patógenas de animales y plantas.

Especie	Efeotor	Localización	Mecanismo orientación	Ligando	Función
<i>Pseudomonas</i> spp.	AvrRpm1	Membrana plasmática	N-miristoilación S-palmitoilación	RINA4	Respuesta defensiva
	HopZ	Membrana plasmática	N-miristoilación S-palmitoilación	HopZ1 de <i>P. syringae</i> interacciona con GmHID1	HopZ1 induce la expresión de <i>gmhid1</i> y la producción de daidzeína en soja (Zhou et al., 2011)
	AvrPphB	Membrana plasmática	N-miristoilación S-palmitoilación	Quinasa PBS1	Modulación de la respuesta de defensa de la planta dependiente de ácido jasmónico
	AvrPto	Membrana plasmática	N-miristoilación S-palmitoilación	Quinasa Ser/Thr Pto	Enzima de conjugación de la ubiquitina ligasa E3 / Inhibición de la muerte celular programada en las células vegetales
	ExoU	Membrana plasmática	Dominio de unión a PtdIns(4,5)P ₂	fosfolipasa ExoU A ₂ de <i>P. aeruginosa</i>	ExoU de <i>P. aeruginosa</i> actúa como fosfolipasa rompiendo la membrana celular eucariota (Anderson et al., 2013)
	Múltiples familias de efectores**	Cloroplastos Mitocondria	Pre-secuencias de cloroplastos y mitocondrias		
<i>Salmonella</i> spp.	SseI	Membrana plasmática	S-palmitoilación	IQGAP1	Media en la infección sistémica a largo plazo mediante la inhibición de la migración normal de la célula hospedadora (McLaughlin et al., 2009)
	SifA	Vacuola que contiene a <i>Salmonella</i> Filamentos inducidos por <i>Salmonella</i>	Prenilación	SKIP y quinesina	Reclutamiento de SKIP a la vacuola que contiene a <i>Salmonella</i> / Modulación del tráfico de vesículas
	SopA	Mitocondria	Desconocido	Desconocido	Ubiquitina ligasa parecida a HECT / Induce la respuesta inflamatoria
	SopB	Vacuola que contiene a <i>Salmonella</i>	Ubiquitilación	Fosfoinosítidos e inositol fosfato	Fosfoinosítidoso e inositol fosfato fosfatasa / Estimulación de la reorganización del citoesqueleto de actina y de la macropinocitosis; entrada de la bacteria en células no fagocíticas; modulación del tráfico de membranas

Tabla 1. Función, dianas, localización y mecanismo de orientación (usado para situarse en el orgánulo) de los efectores identificados en algunos géneros de bacterias patógenas de animales y plantas.

Especie	Efactor	Localización	Mecanismo orientación	Ligando	Función
<i>Xanthomonas</i> spp.	AvrBs3	Núcleo	NLS monopartita	Desconocido	Factor de transcripción / Regula la expresión de genes de la planta
	XopD	Núcleo	Desconocido	SUMOilación de proteínas desconocidas	Suprime los síntomas de la enfermedad y modula la transcripción de los genes del hospedador reprimiendo la expresión de los genes responsables de la producción de SA y JA (Kim et al., 2008)
	AvrXa10	Núcleo	NLS monopartita	Induce la expresión del gen <i>Xa10</i>	La expresión de <i>Xa10</i> induce la muerte celular programada en arroz, <i>N. benthamiana</i> y células Hela de mamíferos (Tiana et al., 2014)
<i>Shigella</i> spp.	IpaH1	Membrana plasmática	S-palmitoilación	Desconocido	Ubiquitina ligasa E3 / ¿Interrumpe la respuesta inflamatoria?
	IpaH4.5	Membrana plasmática	S-palmitoilación	Desconocido	Ubiquitina ligasa E3 / ¿Interrumpe la respuesta inflamatoria?
<i>E. coli</i>	Map	Membrana plasmática Mitocondria	Interacción proteína-proteína. Pre-secuencia de mitocondria	EBP50 / NHERF1	Función desconocida / Induce la diarrea
	EspF	Mitocondria Núcleo Membrana plasmática	¿Pre-secuencia de mitocondria?	WASP; Abcf2; SNX9	Reclutamiento de WASP a la membrana plasmática /reclutamiento de Abcf2 a la mitocondria/Favorece la nucleación de la actina en la membrana plasmática, la unión íntima de las bacterias y las rutas de muerte mitocondrial
	Tir	Membrana plasmática	Desconocido	Nck	Receptor de intimina; reclutamiento de membrana de la señalización y de la maquinaria de nucleación de la actina / Nucleación de la actina en la membrana plasmática; unión íntima de la bacteria a las células hospedadoras

Localización intracelular de múltiples efectores de *Pseudomonas syringae* incluyendo miembros de las familias Avr, Hol, y Hrp predecidos por el programa TargetP. Tabla modificada de **Galán, 2007 y **Hicks y Galán, 2013**.

Los efectores secretados a través del T3SS de S. fredii HH103.

Hasta la fecha se han identificado numerosos efectores de rizobios, denominados Nop (del inglés, Nodulation outer protein), pero no todos están presentes en todas las especies e, incluso, algunos son específicos de algunas de estas bacterias simbiotes. Un ejemplo representativo de este hecho es NopJ, ya que se encuentra en la estirpe NGR234 y no en las estirpes HH103 y USDA257 de *S. fredii*. La estirpe HH103 posee, al menos, los genes que codifican los efectores NopC (~ 11 kDa), NopP (~ 30 kDa), NopL (~ 38 kDa), NopD (~ 149 kDa) y NopM (~ 65 kDa) (**Viprey et al., 1998; Rodrigues et al., 2007**). Otras proteínas que se encuentran en los sobrenadantes de HH103 inducidos con genisteína como NopA, NopB y NopX no son efectores, es decir, no son traslocadas dentro del citoplasma de la célula hospedadora, sino que conforman el *pilus* del T3SS de los rizobios (**apartado 2. 2. de Introducción**). El resto de las proteínas se consideran efectoras y, una vez que son traslocadas al citoplasma de la célula hospedadora, actúan sobre las funciones de la célula vegetal a través de numerosas vías. Muchas de estas proteínas, de patógenos o de simbiotes, ejercen funciones similares o actúan sobre dianas comunes en las células hospedadoras. Incluso, existen efectores homólogos que son secretados por distintos patógenos o rizobios.

Algunos de los efectores, como NopL y NopP (**Ausmees et al., 2004**), son específicos de los rizobios. Ambos se fosforilan por quinasas de las plantas hospedadoras y se ha sugerido que pueden interferir en las rutas de señalización involucradas en respuestas de defensa. Los ensayos de fosforilación *in vitro* realizados por **Bartsev et al. (2003)** demostraron que la proteína NopL de *S. fredii* NGR234 es fosforilada por quinasas de *Nicotiana tabacum* y de *Lotus japonicus*. Además, estudios posteriores revelaron que NopL se fosforila en 4 residuos de serina que presentan un patrón serina/prolina típico de sustratos de MAP quinasas (MAPK, del inglés, Mitogen-Activated Protein Kinase) (**Zhang et al., 2011**). La utilización de extractos proteicos de tabaco y diferentes inhibidores de quinasas indicaron que la quinasa responsable de fosforilar NopL podría ser una serina/treonina MAP quinasa quinasa (MAPKK, del inglés, Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase), sugiriendo que NopL modula las rutas defensivas dependientes de MAPK (**Bartsev et al., 2003**). Los estudios realizados por **Bartsev et al. (2004)** en plantas transgénicas de tabaco demostraron que aquellas plantas que expresaban el gen *nopL* de *S. fredii* NGR234 no eran capaces de activar completamente las respuestas defensivas mediadas por proteínas PR (del inglés,

Pathogenicity Related), lo que las hace ser más susceptibles a la infección por un patógeno. Así, las plantas de tabaco que expresaron este efector y que fueron infectadas con el virus Y de la patata mostraron unos niveles muy bajos de las proteínas quitinasa y β -1,3-endoglucanasa. Además, las plantas transgénicas de *L. japonicus* que expresaban el gen *nopL* mostraron un crecimiento retardado y bajos niveles de quitinasa. Todos estos resultados parecen indicar que NopL, una vez traslocada al interior de la célula hospedadora, podría modular las rutas de transducción de señales a través de la vía de las MAPK que culminan en la expresión de las proteínas PR (**Figura 5**).

Al igual que ocurre con la proteína NopL, NopP también es sustrato de proteínas con actividad quinasa de la planta. Los ensayos realizados por **Skorpil et al. (2005)** con la proteína NopP de *S. fredii* NGR234 demostraron que la fosforilación de este efector por las proteínas quinasas de los microsomas de la leguminosa *Flamingia congesta* se bloquea parcialmente cuando se usan inhibidores de proteínas de tipo tirosina y serina/treonina quinasa. Sin embargo, no se observó inhibición mediante la utilización del inhibidor de las proteínas MAPKK, como sucedía con el efector NopL. Curiosamente, en la leguminosa hospedadora *F. congesta*, NopP y NopL parecen tener efectos antagonistas. El mutante en *nopP* forma más nódulos fijadores que la estirpe silvestre, mientras que la eficiencia en la nodulación del mutante en *nopL* se ve severamente afectada (**Ausmees et al., 2004; Marie et al., 2003**). En soja Williams, el mutante en el gen *nopP* de *S. fredii* HH103 mejoró la capacidad simbiótica respecto a la estirpe parental, aumentando el número y masa fresca de los nódulos, además de la masa seca de la parte aérea. En cambio, este mismo mutante, alteró negativamente todos estos parámetros en la simbiosis con *E. variegata* (**López-Baena et al., 2009**) (**Tabla 2 y Figura 5**).

NopC es otra proteína específica de los rizobios y en la literatura diversos autores han considerado esta proteína como parte de la estructura del T3SS, por su localización en el genoma y por su tamaño, muy similar a NopA, componente del apéndice extracelular o *pilus* del T3SS de los rizobios. Sin embargo, además de no existir trabajos experimentales sobre esta proteína, el análisis informático de la estructura de NopC indica que posee un porcentaje bajo en el contenido en α -hélice (30-50%) en su estructura secundaria, lo que parece incumplir los requisitos necesarios para ser incluida dentro de los componentes del *pilus* (**Deakin y Broughton, 2009**).

El resto de los posibles efectores secretados a través del T3SS de los rizobios presentan cierta identidad o son homólogos a otros efectores de bacterias patógenas de animales o plantas. NopM es una proteína rica en repeticiones de leucina (LRR, del inglés, Leucine-Rich Repeat) y fue identificada por primera vez por **Rodrigues et al. (2007)** a través de una aproximación proteómica, mediante la comparación de las proteínas extracelulares de la estirpe silvestre *S. fredii* HH103 y un mutante derivado deficiente en el T3SS, inducidos con un flavonoide inductor de los genes *nod*. Posteriormente, este efector se ha detectado en otras estirpes de rizobios, como *S. fredii* NGR234, *B. japonicum* USDA110 o *B. elkanii* USDA61. La comparación de la secuencia aminoacídica de esta proteína con otros genomas bacterianos que presentan el T3SS indica que NopM pertenece a la familia de efectores IpaH, como son IpaH9.8 e IpaH1.4 de *Shigella flexneri*, o SspH1, SspH2 y SlrP de *S. enterica* (**Bernal-Bayard y Ramos-Morales, 2009; Quezada et al., 2009; Rohde et al., 2007; Singer et al., 2008; Zhu et al., 2008**). Además, NopM también presenta similitud con el efector YopM del patógeno animal *Yersinia pestis* (**Marie et al., 2004; Soundararajan et al., 2011**). Incluso se han encontrado otras proteínas con secuencias similares, pero menos relacionadas, que corresponden a efectores no caracterizados en otras bacterias, como los de los fitopatógenos *P. syringae* y *R. solanaceum* (**Mukaihara y Tamura, 2009**). Aunque las proteínas de la familia IpaH-SspH-YopM no poseen señales de localización nuclear, se ha comprobado que, tanto IpaH9.8, como SspH1 y YopM se dirigen al núcleo de la célula hospedadora animal (**Abramovitch et al., 2006; Benabdillah et al., 2004; Shan et al., 2008**). IpaH9.8 de *S. flexneri* es una ubiquitina ligasa E3 que contiene un dominio NEL (del inglés, Novel E3 Ligase) y cuya actividad enzimática se ha confirmado en otros efectores de esta familia. Además, la estructura de estos efectores difiere del resto de proteínas de tipo ubiquitina ligasa E3, por lo que reciben el nombre de efectores con dominio NEL. Su función parece estar relacionada con la mimetización de la actividad ubiquitina ligasa E3 del hospedador para la consecuente ubiquitinación y degradación de dianas específicas vía proteosoma (**Xin et al., 2012**). De esta forma, distintos efectores pueden bloquear el sistema inmune del organismo hospedador o degradar proteínas como la tiorredoxina o REDj3, chaperona del retículo endoplasmático (RE) (**Ashida et al., 2010; Bernal-Bayard et al., 2010**).

Los estudios realizados por **Xin et al. (2012)** indicaron que NopM de *S. fredii* NGR234 podría poseer actividad ubiquitina ligasa E3 y fue el primer efector

descubierto con dominio NEL presente en un microorganismo que interacciona con células vegetales (**Figura 5**). Además, los autores sugieren que este efector podría actuar durante la simbiosis ubiquitinando una o más proteínas dianas del hospedador, hecho que se correlaciona positivamente con la promoción de la nodulación en la leguminosa *Lablab purpureus*. Sin embargo, el efecto de la actividad de esta proteína en otras plantas leguminosas puede ser neutro o, incluso, afectar negativamente a la nodulación, lo que podría estar potencialmente relacionado con el reconocimiento de este efector por proteínas R (del inglés, Resistance proteins) específicas de la planta (**Kambara et al., 2009; Xin et al., 2012; Yang et al., 2010**) (**Tabla 2**). Por otro lado, los autores comprobaron que la expresión de NopM en células de tabaco inhibe la respuesta de defensa mediada por la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés, Reactive Oxigen Species) y sugieren que la posible función de este efector es el mantenimiento de bajos niveles de ROS en el desarrollo de los tubos de infección de *L. purpureus* para no desencadenar las respuestas de defensa de la leguminosa (**Xin et al., 2012**).

La proteína NopD se identificó por primera vez en la estirpe *S. fredii* HH103 por **Rodrigues et al. (2007)**. El análisis de su secuencia aminoacídica indicó que NopD es homóloga a la proteína hipotética Blr1693 de *B. japonicum* y a la proteína Msi059 de *M. loti*, secretada a través del T4SS o T3SS por las estirpes R7A y MAFF303099, respectivamente (**Hubber et al., 2004**). Además, el gen *nopD* presenta homología con el gen MA20_12780 de *B. japonicum* Is-34. En la interacción *Rhizobium*-leguminosa entre esta estirpe y los cultivares de soja que presentan el gen *Rj4*, es MA20_12780 el responsable del bloqueo de la nodulación (**Tsurumaru et al., 2014**). Por otro lado, NopD comparte cierta similitud con el efector XopD de *Xanthomonas* spp., ya que ambas poseen un dominio cisteína proteasa C48. Los estudios realizados sobre el efector XopD indican que esta proteína actúa como proteasa en el núcleo de la célula vegetal modificando proteínas dianas “SUMOiladas” (SUMO, del inglés, Small Ubiqutin-related MOdifier) (**Figura 5**). Su actividad proteasa le permite romper los precursores SUMO, eliminando esta etiqueta que se encuentra conjugada a proteínas de la célula, lo que podría ser un mecanismo utilizado para alterar las rutas de señalización del hospedador en beneficio del patógeno.

El efector NopT (**Dai et al., 2008**) comparte similitud con la proteína ID797 de *B. japonicum* USDA110 y ambas, a su vez, con la de tipo Avr denominada AvrPphB del

fitopatógeno *P. syringae* y con YopT de *Yersinia* spp. (Jenner *et al.*, 1991). Todos ellos forman parte de una superfamilia de proteínas caracterizadas por poseer un dominio cisteína proteasa C58 en el que se encuentra muy conservado una triada catalítica de aminoácidos, esenciales para su actividad proteasa (Shao *et al.*, 2002). Estos efectores, incluido NopT, presentan actividad autoproteolítica y son capaces de retirar de su propia secuencia peptídica una serie de residuos de la parte amino terminal, dejando expuesta una secuencia consenso de miristoilación. Consecuentemente, los efectores son N-miristoilados (y S-palmitoilados) por enzimas de origen vegetal para así localizarse en la membrana plasmática de la célula hospedadora (Nimchuk *et al.*, 2000; Puri *et al.*, 1997; Tampakaki *et al.*, 2002). Los estudios de mutagénesis han revelado que el dominio proteasa de este tipo de efectores es el responsable de activar las respuestas de defensa. El efector AvrPphB ejerce su actividad proteasa sobre la quinasa PBS1 de la membrana plasmática de las células de *A. thaliana*, siendo detectado por la planta a través de receptores específicos y, consecuentemente, disparando la respuesta inmune (Kambara *et al.*, 2009; Shao *et al.*, 2003) (Figura 5). Este hecho podría ser el responsable del efecto extremadamente negativo que ejerce NopT de *S. fredii* NGR234 en la nodulación con *Crotolaria juncea* (Tabla 2). Sin embargo, y a pesar de que existen muchos posibles efectores secretados al interior de la célula vegetal por los rizobios, solo se ha confirmado la translocación al interior del citoplasma de la célula vegetal de los efectores NopP de *S. fredii* USDA257 y NopE1 y NopE2 de *B. japonicum* USDA110 (Schechter *et al.*, 2010; Wenzel *et al.*, 2010).

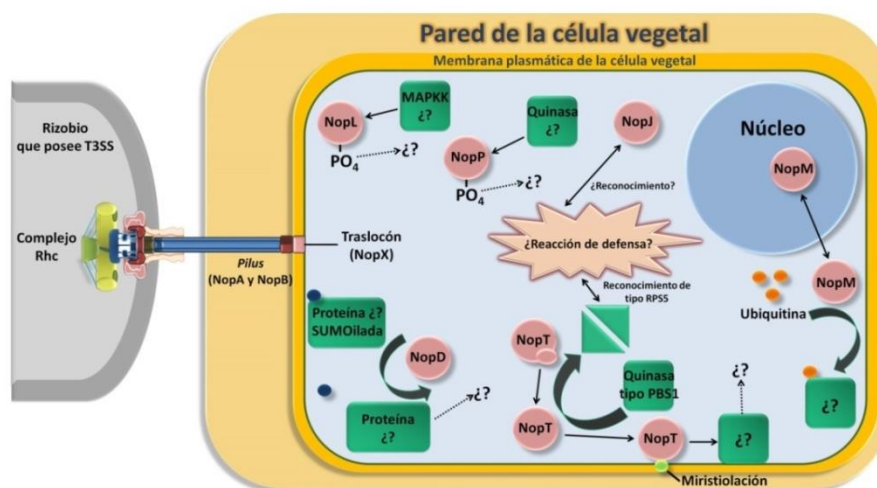


Figura 5. Representación de la función potencial de algunos efectores secretados a través del T3SS de los rizobios. Los efectores (Nop) están representados como círculos rosas y las proteínas de origen vegetal como cuadros verdes. Figura modificada a partir de la publicada por Deakin y Broughton (2009).

Tabla 2. Efecto de la mutación del T3SS y de algunos genes *nop* sobre el comportamiento simbiótico de distintas estirpes de rizobios en sus leguminosas hospedadoras. Tabla modificada a partir de la publicada por **Deakin y Broughton (2009)** y de **López-Baena (2008)**.

Estirpe	Proteínas secretadas	Mutación	Ningún efecto	Efecto positivo	Efecto negativo
<i>S. fredii</i> HH103	NopL, NopP, NopD, NopM, NopX (detectadas por LC-MALDI-MS), NopL, NopP y NopX, NopA y NopC (detectadas usando los anticuerpos procedentes de la estirpe NGR234)	T3SS no funcional	<i>Cajanus cajan</i> (D)	<i>Erythrina variegata</i> (D)	<i>Glycine. max</i> cv. Williams (D) <i>G. max</i> cv. Peking (D) <i>G. max</i> cv. Heinong 33 (D) <i>G. max</i> cv. Kochi (D) <i>G. max</i> cv. Tribune (D) <i>Glycyrrizha uralensis</i> (I)
		<i>nopX</i>	<i>G. max</i> cv. Williams (D)		<i>G. max</i> cv. Peking (D)
		<i>nopP</i>		<i>G. max</i> cv. Williams (D)	<i>E. variegata</i> (D)
<i>S. fredii</i> NGR234	NopA, NopB, NopC, NopJ, NopL, NopM, NopP, NopT y NopX (identificadas por secuenciación amino terminal). NopB y NopC fueron detectadas por LC-MALDI-TOF-MS y NopB mediante <i>phage display</i> .	T3SS no funcional	<i>Leucaena leucocephala</i> (I) <i>Lotus japonicus</i> (D) <i>Vigna unguiculata</i> (D)	<i>Crotalaria juncea</i> (I) <i>Pachirhizus tuberosus</i> (D) <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. W.J.B. (D) <i>P. vulgaris</i> cv. P.Laraguet (D) <i>P. vulgaris</i> cv. W.J.D. (D)	<i>Lablab purpureus</i> (I) <i>Flaminga congesta</i> (D) <i>Tephrosia vogelii</i> (I)
		<i>nopA</i>	<i>L. leucocephala</i> (I) <i>V. unguiculata</i> (D)	<i>P. tuberosus</i> (D)	<i>T. vogelii</i> (I)
		<i>nopB</i>		<i>P. tuberosus</i> (D)	<i>F. congesta</i> (D) <i>T. vogelii</i> (I)
		<i>nopL</i>	<i>T. vogelii</i> (I) <i>P. tuberosus</i> (D)		<i>F. congesta</i> (D)
		<i>nopP</i>	<i>F. congesta</i> (D) <i>P. tuberosus</i> (D)	<i>V. unguiculata</i> (D)	
		<i>nopT</i>		<i>Crotalaria juncea</i> (I)	<i>P. vulgaris</i> cv. Yudou (D) <i>T. vogelii</i> (I)
		<i>nopJ</i>			Afecta negativamente sobre todas las relaciones simbióticas (Kambara et al., 2009)

Tabla 2. Efecto de la mutación del T3SS y de algunos genes *nop* sobre el comportamiento simbiótico de distintas estirpes de rizobios en sus leguminosas hospedadoras. Tabla modificada a partir de la publicada por **Deakin y Broughton (2009)** y de **López-Baena (2008)**.

Estirpe	Proteínas secretadas	Mutación	Ningún efecto	Efecto positivo	Efecto negativo
<i>S. fredii</i> USDA257	NopX (detección mediante un anticuerpo específico), NopP, NopA y NopB (identificadas por secuenciación amino terminal y por inmunodetección con anticuerpos específicos)	T3SS no funcional	<i>V. unguiculata</i> (D)	<i>G. max</i> cv. McCall (D) <i>Erythrina</i> spp. (D)	<i>G. max</i> cv. Peking (D) <i>Macroptilium atropurpureum</i> (D)
		<i>nolWXBTUV</i>	<i>G. max</i> cv. Peking (D)	<i>G. max</i> cv. McCall (D) <i>Erythrina</i> spp. (D)	
		<i>nopB</i>	<i>V. unguiculata</i> (D)	<i>G. max</i> cv. McCall (D)	<i>G. max</i> cv. Peking (D) <i>M. atropurpureum</i> (D)
		<i>nopP</i>	<i>G. max</i> cv. McCall (D)		
<i>B. japonicum</i> USDA110	NopP, GunA2 (detectadas por MALDI-TOF-MS), NopC, NopL, NopF, NopH, NopZ, NopU, NopE1 y NopE2 (Tampakaki, 2014; Tsukui <i>et al.</i> , 2013; Wenzel <i>et al.</i> , 2010)	T3SS no funcional	<i>V. unguiculata</i> (D)		<i>G. max</i> cv. Williams (D) <i>M. atropurpureum</i> (D)
		<i>nopE1</i>	<i>Glycine max</i> (D) <i>M. atropurpureum</i> (D)		
		<i>nopE2</i>	<i>Glycine max</i> (D) <i>M. atropurpureum</i> (D)		
		<i>nopE1 nopE2</i>			<i>Glycine max</i> (D) <i>M. atropurpureum</i> (D)
<i>M. loti</i> MAFF303099	Posiblemente Mlr6316	T3SS no funcional	<i>Lotus corniculatus</i> (D)	<i>L. leucocephala</i> (I)	
<i>B. elkanii</i> USDA61	NopB, NopL, NopX, NopC, NopA y NopM (detectadas por secuenciación) (Okazaki <i>et al.</i> , 2009)	T3SS no funcional (USDA61)		<i>G. max</i> cv. Hill (D)	<i>G. max</i> cv. Clark-rj1 (D) (incapaz de reconocer a los factores Nod)

(D), nódulos determinados. (I), nódulos indeterminados.

3. El sistema inmune de las plantas.

En el medio natural las plantas se encuentran constantemente expuestas a organismos fitopatógenos y cada uno de ellos posee un modo diferente para invadirlas. Así, algunas especies pueden penetrar a través de las capas superficiales mediante el ataque enzimático o por presión mecánica, otras entran a través de las aperturas naturales e, incluso, se encuentran aquellas que invaden las células vegetales a través de las heridas previamente originadas. Una vez dentro de la planta, los patógenos pueden proliferar mediante la utilización de estrategias que se pueden basar en el uso de la planta como sustrato, causando la muerte celular (necrotrófico), manteniéndola viva (biotrofo) o permitiendo inicialmente que las células vivan, para acabar matándolas en los estadios posteriores de la infección (hemibiotrofos). En todos los casos actúan mediante diversas aproximaciones en las que desencadenan multitud de procesos que culminan en su propio beneficio. Los vertebrados poseen un sistema inmune que incluye células móviles y especializadas que actúan en la recepción y dispersión, a través del sistema circulatorio, de las señales generadas durante el proceso de infección por un patógeno, proporcionando al animal una inmunidad específica de antígeno y memoria inmunológica. En cambio, la condición de inmovilidad de las plantas ha propiciado que se desarrolle un sistema inmune basado en la inmunidad innata, disparada en la célula infectada (sin que estén especializadas), y en las señales sistémicas originadas desde el lugar de infección que, en ocasiones, pueden generar “memoria” inmunológica (Ausubel, 2005; Chisholm *et al.*, 2006; Dangl y Jones, 2001; Spoel y Dong, 2012). De esta forma, y a diferencia de los animales, cada célula vegetal posee la capacidad de disparar las respuestas inmunes de forma autónoma.

Jones y Dangl (2006) establecieron una división del sistema inmune de las plantas en dos niveles (Figura 6 y 7). La primera línea de defensa se sitúa en la superficie de la célula vegetal y se basa en la utilización, por parte de las plantas, de receptores transmembrana para reconocer ciertas moléculas del organismo patógeno. El segundo nivel se da intracelularmente, donde se encuentran un grupo de proteínas de la planta que reconocen específicamente a los efectores translocados por el organismo patógeno al interior de la célula hospedadora. Estos mismos autores pusieron de manifiesto la

importancia del sistema inmune de las plantas y propusieron un modelo ilustrativo en *zig zag* dividido en cuatro fases:

i) Debido a la vulnerabilidad de las plantas a la infección por los organismos patógenos del ambiente, éstas han desarrollado un mecanismo rápido y eficaz para detectar y evitar la colonización de la mayoría de los patógenos. El proceso consiste en el reconocimiento de los patrones moleculares denominados MAMP o PAMP (del inglés, Microbial o Pathogen-Asociated Molecular Patterns, respectivamente) de los organismos patógenos por los receptores transmembrana PRR (del inglés, Pattern Recognition Receptors) específicos de las plantas. Este reconocimiento tiene como resultado la activación de la PTI o MTI (del inglés, PAMP-Triggered Immunity o MAMP-Triggered Immunity, respectivamente), que puede llegar a detener la colonización del patógeno (**Figura 6 y 7**).

ii) Muchos patógenos han evolucionado empleando proteínas efectoras que contribuyen a la virulencia y que pueden interferir con la respuesta PTI, resultando en un proceso denominado susceptibilidad activada por efectores o ETS (del inglés, Effector-Triggered Susceptibility).

iii) Por otro lado, un efector puede ser específicamente reconocido por una proteína NB-LRR de la planta (NB, del inglés, Nucleotide Binding, y LRR, del inglés, Leucine Rich Repet), lo que desencadena una respuesta inmune denominada inmunidad activada por el efector o ETI (del inglés, Effector-Triggered Immunity) (**Figura 6 y 7**). Este reconocimiento puede darse directamente a través de la interacción directa entre los efectores detectados por la planta y las proteínas R (proteínas de resistencia de la planta) (**Gabriel y Rolfe, 1990**) o indirectamente mediante la detección de la actividad enzimática del efector (**Innes, 2004**).

iv) El proceso de selección natural conduce a los patógenos a evitar la respuesta ETI, mediante modificaciones del gen que codifica el efector reconocido por la planta o mediante la adquisición de un nuevo efector que tiene la capacidad de suprimir la respuesta ETI. En consecuencia, la presión evolutiva origina la aparición de nuevas proteínas R específicas de la planta, capaces de reconocer al nuevo efector y permitiendo la activación de la ETI (**Figura 6 y 7**).

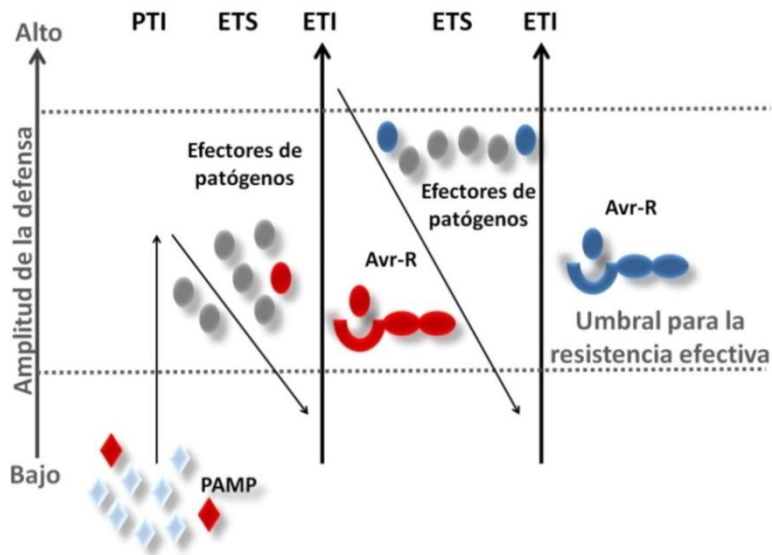


Figura 6. Modelo en *zig zag* que representa co-evolución dinámica de la interacción planta-microorganismo. Figura modificada del trabajo de **Jones y Dangl (2006)**. PAMP (del inglés, Microbial o Pathogen-Asociated Molecular Patterns, respectivamente). PTI (del inglés, PAMP-Triggered Immunity). ETS (del inglés, Effector-Triggered Susceptibility). ETI (del inglés, Effector-Triggered Immunity).

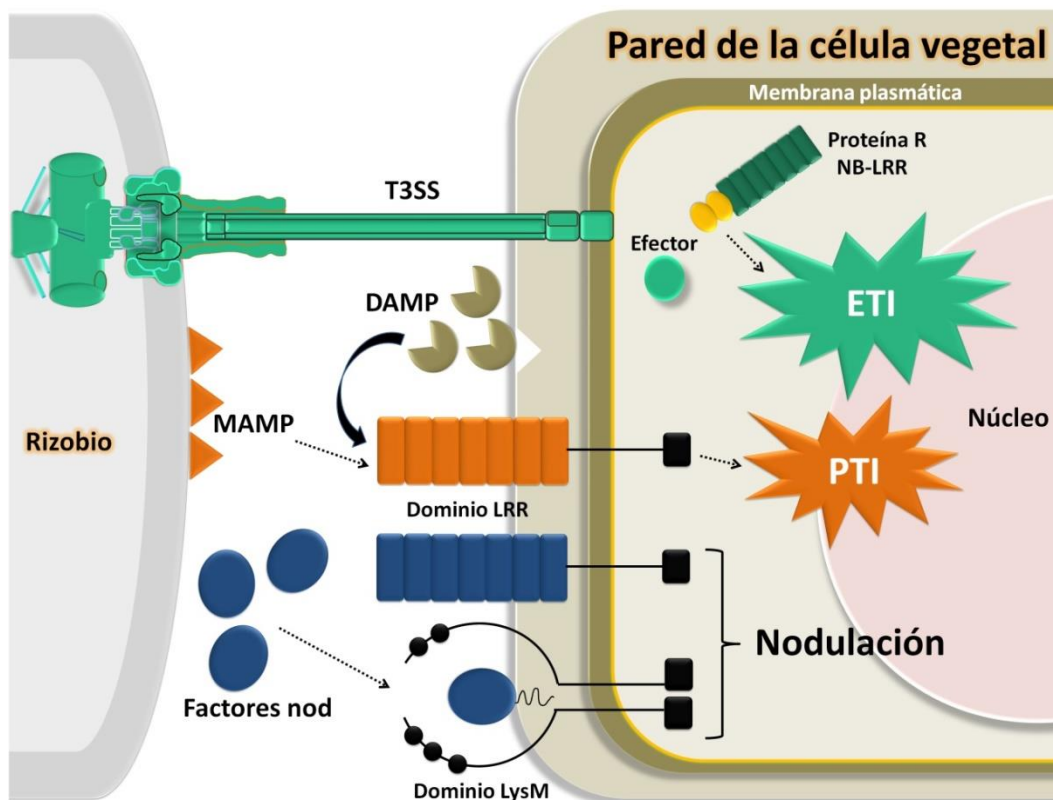


Figura 7. Posibles interacciones que pueden darse ante el reconocimiento de un rizobio por parte de la leguminosa hospedadora. MAMP (del inglés, Microbial-Asociated Molecular Patterns, respectivamente). DAMP (del inglés, Damage-Asociated Molecular Patterns). MTI (del inglés, MAMP-Triggered Immunity).

3. 1. Los receptores transmembrana PRR reconocen los PAMP o MAMP.

Entre los receptores vegetales de tipo PRR se encuentran los receptores quinasa RK (del inglés, Receptor Kinases) y las proteínas tipo receptor RLP (del inglés, Receptor-Like Proteins). La estructura de los primeros consta de un ectodominio de unión a ligando LRR, un dominio transmembrana simple y un dominio quinasa intracelular, mientras que el segundo carece del dominio intracelular, lo cual le obliga a funcionar junto a receptores RK para transmitir la señal. Debido a que los PAMP o MAMP se encuentran muy conservados entre especies, géneros, familias o clases, estos receptores vegetales detectan a todos los microorganismos que los posean, sean o no patógenos, activando la inmunidad PTI. De esta forma, se da una resistencia contra los patógenos no adaptados, además de contribuir a la inmunidad basal durante la infección. Por otro lado, la inmunidad puede activarse por moléculas propias de la planta, como fragmentos de la pared celular (generados por daños en la célula) o péptidos derivados del proceso de degradación (generados por el reconocimiento de patógenos). Estas moléculas se denominan DAMP (del inglés, Damage-Associated Molecular Patterns) (**Figura 6**). A pesar de que los receptores de las plantas y los animales poseen características comunes, el modo de vida tan diferente de ambos grupos de organismos puede haber determinado que sus sistemas inmunes presenten claras diferencias. Una de ellas es que únicamente los receptores PRR de las plantas parecen reconocer a los PAMP. Sin embargo, los animales emplean tanto los receptores de superficie como los intracelulares para el reconocimiento estos patrones moleculares. Además, los animales presentan un conjunto muy limitado de receptores PRR, mientras que las plantas tienen un gran número de proteínas RK y RLP que son potencialmente receptores PRR. A pesar de que ambos presentan algunas características comunes, como el reconocimiento de PAMP muy conservados (por ejemplo, la flagelina bacteriana), tanto los epitopos reconocidos por estas moléculas como los receptores PRR son diferentes, lo que apoya la idea sobre el mecanismo de convergencia evolutiva entre ambos tipos de organismos (**Zipfel, 2014**).

Entre las PAMP detectados en los organismos patógenos se encuentran la quitina y el ergosterol de los hongos, y la flagelina, el factor de elongación Tu (EF-Tu, del inglés, Elongation Factor Tu), los LPS (del inglés, Lipopolysaccharides), la proteína de choque térmico CHSP22 y el ADN de las bacterias (**Erbs y Newman, 2012; Felix y Boller, 2003; Yakushiji et al., 2009**). La quitina es una molécula incluida dentro del grupo de

los quito-oligosacáridos, capaces de activar los mecanismos de defensa de las plantas cuando son reconocidos por receptores caracterizados por contener numerosos dominios de tipo LysM (del inglés, Lysin Motif). Dentro de los quito-oligosacáridos se encuentran los factores Nod secretados por los rizobios, y su reconocimiento por receptores de este tipo en plantas compatibles no desemboca en una respuesta defensiva, sino en el establecimiento de la simbiosis y el desarrollo de los nódulos, por lo que es posible que la señalización a través de los factores Nod se encuentre, en parte, asociada con la supresión de las respuestas de defensa (**Luo y Lu, 2014**). Sorprendentemente, el reconocimiento de estas moléculas por receptores similares (de otras plantas o incluso de la misma) puede conllevar procesos no tan positivos para la simbiosis. Se cree que esto es debido a que los rizobios han evolucionado mediante la adición de decoraciones sobre estas moléculas quito-oligosacáridicas para evadir la activación de las respuestas de defensa de la planta y así culminar en una relación simbiótica. En concordancia con esta hipótesis, estudios recientes han demostrado que la adición de estas moléculas sobre plantas no leguminas reduce el número de receptores PRR, dando lugar a una reducción de las respuestas mediante la supresión de la PTI (**Liang *et al.*, 2013**). Existen algunos estudios que muestran que ciertos MAMP de los rizobios suprimen las respuestas de defensa, como los LPS o los EPS (**Zamioudis y Pieterse, 2011**), aunque aún no se conoce ninguno de los que activan las respuestas de defensa (**Gourion *et al.*, 2014**). Sin embargo, los MAMP o PAMP son necesarios para la supervivencia y dispersión de los microorganismos (**Boller y Felix, 2009**), por lo que no es de extrañar que los rizobios y las bacterias patógenas presenten otros patrones moleculares similares capaces de activar las respuestas de defensa basales en las plantas.

Las moléculas más estudiadas entre los PAMP son la flagelina y el factor de elongación Tu (EF-Tu) de las bacterias. La primera es reconocida a través de numerosos epitopos por el receptor FLS2 (del inglés, Flagellin-Sensing 2) de las plantas. Esta interacción PRR/PAMP fue la primera que se caracterizó y la unión de los dos componentes desencadena un reclutamiento instantáneo de la proteína BAK1, que actúa como co-receptor de la flg22 (péptido sintético de un dominio conservado de la flagelina), y esta dimerización es esencial para la completa activación de la inmunidad PTI (**Gomez-Gomez y Boller, 2000**). La naturaleza común e invariante de los PAMP o MAMP, como la flagelina bacteriana, hace que la respuesta PTI sea efectiva en la prevención contra la mayoría de patógenos (**Monaghan y Zipfel, 2012**).

La actividad de las respuestas de defensa continuada y fuerte en el tiempo puede derivar en efectos muy perjudiciales para el organismo hospedador. Por este motivo, las plantas, al igual que los animales, han desarrollado mecanismos con el fin de modular la intensidad de la activación del sistema inmune, como la internalización y la degradación de los receptores PRR mediante modificaciones postraduccionales, por ejemplo, la desfosforilación o la ubiquitinación del dominio citosólico de estos receptores (**Lu et al., 2011; Sorkin y von Zastrow, 2009**).

Generalmente, la respuesta basal activada durante la PTI por el reconocimiento de un patógeno virulento por su hospedador susceptible es suficiente para evitar la colonización del organismo infeccioso y, si la planta consigue controlar la infección, se generará la denominada resistencia basal a la enfermedad. Sin embargo, muchos patógenos han desarrollado estrategias para asegurar una infección exitosa, como evitar el reconocimiento por parte de la planta de estos MAMP o PAMP (**Dodds y Rathjen, 2010**). Por ejemplo, muchas bacterias Gram-negativas han adquirido la capacidad de inyectar efectores a través del T4SS y T3SS al interior de la célula hospedadora y así manipular el sistema inmune del hospedador para contribuir de forma positiva en su propia patogenicidad (**Christie y Vogel, 2000; Hueck, 1998**).

3. 2. Las proteínas R, receptores de los efectores bacterianos.

Evolutivamente, los efectores permiten a los patógenos superar la PTI pero, a su vez, pueden llegar a ser reconocidos por las plantas a través de las proteínas R, dando lugar a una interacción patógeno-planta incompatible. Cuando ésto ocurre, el gen que codifica ese efector se denomina de forma general gen *Avr* (del inglés, Avirulence) y como consecuencia de la interacción se activa en la planta la respuesta ETI, que culmina en la resistencia a la enfermedad específica de cultivar o resistencia gen-por-gen (**Keen, 1990**). A diferencia de la inmunidad por PTI, que es disparada por las moléculas que se encuentran muy conservadas en la mayoría de bacterias y hongos, la resistencia gen por gen es específica de cada efector. El mecanismo por el que las plantas pueden reconocer una gran variedad de efectores mediante un conjunto de proteínas R, cuya estructura es muy similar, está aún por investigar. Por ejemplo, se han identificado entre 150 y más de 600 genes *R* en los genomas de *A. thaliana* y arroz, respectivamente, y se ha comprobado que estos genes se encuentran en “clusters” situados en zonas de una alta tasa de recombinación. Sin embargo, la mayoría de los genes *R* codifican proteínas de

tipo NB-LRR, cuya estructura consta básicamente de una región amino variable, seguida de un dominio de unión a nucleótido (NB) en el centro y un dominio de repeticiones ricas en leucina (LRR) en el extremo carboxilo, estructura similar a la de los receptores intracelulares NLS del sistema inmune de animales (**Bakker et al., 2006; Goff et al., 2002; Meyers et al., 2003; Spoel y Dong, 2012**).

Los efectores de patógenos pueden ser reconocidos directamente a través de las proteínas codificadas por los genes específicos de resistencia (*R*), pero también este reconocimiento puede darse indirectamente. La detección indirecta ha sido descrita mediante la hipótesis de “la guardia” en la que se postula que las proteínas de resistencia *R* están asociadas constitutivamente a proteínas de la propia planta. La translocación de ciertos efectores *Avr* de los patógenos causa alteraciones en la estructura cuaternaria de estas proteínas vegetales, siendo detectadas por las proteínas *R* (**Dangl y Jones, 2001; Van der Biezen y Jones, 1998**). El ejemplo más conocido que se adapta a esta hipótesis se ha encontrado en *Arabidopsis thaliana*. Las proteínas *R* RPM1 y RPS2 interactúan con la proteína guardián RIN4 y, cuando los efectores *AvrRpm1*, *AvrB* y *AvrRpt2* de *P. syringae* son liberados al citoplasma de la célula vegetal, RIN4 es fosforilada en múltiples residuos de treonina, señal que activa a las proteínas *R* (**Kim et al., 2005; Liu et al., 2011**). De forma alternativa, las plantas pueden utilizar proteínas señuelo que comparten similitudes estructurales con las dianas de los efectores de patógenos y cuya interacción desencadena la activación de las proteínas *R* (**Van der Hoorn y Kamoun, 2008**).

Aunque la determinación del rango de hospedador en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa se ha relacionado siempre con el reconocimiento de los factores Nod por parte de receptores transmembrana específicos de las leguminosas hospedadoras, existen estudios que demuestran la importancia del T3SS en este proceso. Se han identificado numerosos genes que codifican para proteínas *R* en diferentes variedades de soja, como *Rj2* y *Rfg1* (alelos de un mismo locus), *Rj3* y *Rj4*. En algunos casos, el reconocimiento específico de ciertos efectores de rizobios por estas proteínas *R* desemboca en un bloqueo total de la nodulación (**Hayashi et al., 2012; Yang et al., 2010**). Así, *B. elkanii* USDA122 no es capaz de nodular la variedad Hardee de soja que presenta el gen *Rj2* y algunas estirpes de *S. fredii* son incapaces de nodular las variedades de soja americanas que presentan el gen *Rfg1* (**Meinhardt et al., 1993; Tsukui et al., 2013**). Estos dos genes codifican proteínas miembros de la clase TIR-

NBS-LRR (del inglés, Toll Interleukin Receptor – Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat), relacionados con la defensa contra patógenos (Yang *et al.*, 2010).

Al igual que ocurre con los receptores de membrana PRR, la elevada expresión de los genes *R* proporciona efectos negativos sobre la planta, por lo que esta expresión se encuentra muy controlada. Así, por ejemplo, en *A. thaliana* se ha determinado que la expresión de un determinado gen *R* es dependiente del ritmo circadiano y del momento de esporulación del hongo patógeno *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Wang *et al.*, 2011).

La resistencia a la enfermedad mediada por los receptores o proteínas R de tipo NB-LRR es efectiva contra los patógenos biotrofos obligados o hemibiotrofos, pero no para aquellos patógenos que matan a las células de los tejidos del organismo hospedador durante su colonización (Glazebrook, 2005). Algunos patógenos han conseguido suprimir las respuestas de defensa generadas por el reconocimiento de ciertos efectores por proteínas R a través de otros efectores traslocados mediante los sistemas de secreción.

3. 3. Respuestas de defensa activadas durante la PTI y la ETI.

Como ya se ha comentado, el reconocimiento de los PAMP o MAMP dispara la PTI y, consecuentemente, se activan numerosas respuestas de defensas basales y transitorias (Tabla 3). Respecto a la relación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa, algunos estudios han revelado que estos microorganismos deben poseer ciertos MAMP que activan las respuestas de defensa. Así, en las etapas más tempranas de la nodulación en los modelos *L. japonicus* y *Medicago truncatula* se inducen numerosos genes relacionados con la defensa y el estrés, lo que indica que en un primer momento la leguminosa reconoce a su hospedador como una potencial amenaza. Sin embargo, en etapas más avanzadas, estos genes se inhiben por mecanismos desconocidos hasta el momento y son activados los genes de nodulación (Maunoury *et al.*, 2010; Moreau *et al.*, 2011). Muchos patógenos se sirven de los efectores para suprimir estas respuestas de defensa y las plantas, a su vez, pueden reconocer ciertos efectores mediante las proteínas R dando lugar a la ETI, que es básicamente una respuesta PTI, pero más rápida y amplificadas, y que suele dar lugar a una respuesta hipersensible (HR, del inglés Hypersensitive cell death Response). Algunos efectores mimetizan (y otros inhiben) las funciones celulares

eucariotas y ayudan a la supresión de uno a más componentes de la PTI o ETI. Existen muchos mecanismos que se solapan en las respuestas PTI y ETI. Sin embargo, se conoce que algunos efectores están dirigidos hacia la supresión de los mecanismos de respuesta producidos en la PTI y no en la ETI, y viceversa.

El reconocimiento de los PAMP, MAMP (PTI) o de los efectores de los patógenos trasladados al interior de las células vegetales (ETI) dispara diversas respuestas de defensas tempranas, entre las que se incluyen el flujo de calcio, la activación de numerosas MAPK, la producción de ROS y la inducción de la síntesis de ET. A su vez, estos procesos se encuentran involucrados en la señalización de las respuestas intermedias y tardías que se dan durante el proceso de infección, como la expresión de numerosos genes de defensa, el engrosamiento de la pared celular, la biosíntesis de fitoalexinas, la respuesta hipersensible y, en ciertas ocasiones, la resistencia inducida. Además, en las partes de la planta que se encuentran alejadas de la zona de infección, puede desarrollarse una respuesta sistémica adquirida (SAR, del inglés, Systemic Acquired Resistance) que genera un aumento de la resistencia ante una posterior infección por el patógeno (**Tabla 3**) (Meng y Zhang, 2013).

Tabla 3. Respuestas de defensas activadas durante las respuestas PTI y ETI.

Respuestas de defensas activadas en la PTI y ETI
Activación de las rutas de MAPK
Activación de las cascadas de señalización intracelular asociadas al flujo de iones a través de la membrana plasmática
Incremento del calcio intracelular
Producción de ROS
Producción de óxido nítrico
Cambio en el estado de fosforilación de numerosas proteínas
Deposición de calosa sobre la pared celular
Cambios en el balance hormonal (etileno, ácido salicílico, etc.)
Cierre de los estomas para evitar la entrada de patógenos por estas aberturas
Reprogramación de la transcripción de numerosos genes de la planta, entre los que se encuentran genes de defensa
Producción de compuestos antimicrobianos como las fitoalexinas
Activación de la HR (normalmente asociada con la ETI)
Activación de los genes <i>PR</i>
Activación de la SAR (asociada principalmente con la ETI)

Activación de las rutas de MAPK.

La inducción de las MAPK es uno de los primeros eventos de señalización disparado por los receptores PRR y las proteínas R tras el reconocimiento de los MAMP y los efectores, respectivamente. A su vez, este fenómeno se encuentra incluido en la compleja red de señalización que regula la activación de las respuestas de defensa a través de la fosforilación de proteínas diana, incluyendo diversas enzimas o factores de transcripción, controlando la síntesis y/o la señalización de las hormonas de defensa, reprogramando la expresión de diversos genes o dirigiendo el flujo metabólico hacia la síntesis de metabolitos antimicrobianos, entre otras respuestas. La activación de las MAPK se lleva a cabo por las MAPKK a través de la fosforilación de una treonina (Thr) y una tirosina (Tyr) sobre el dominio de activación Thr-X-Tyr. Al mismo tiempo, las MAPKK se encuentran reguladas mediante su activación por las MAPKK quinasas (MAPKKK, del inglés, Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase/s) a través de la fosforilación de dos residuos serina/treonina (Ser/Thr) en el bucle de activación Ser/Thr-X3-5-Ser/Thr de las MAPKK, aunque el conocimiento sobre este grupo de quinasas es muy escaso. Las cascadas que conforman estos tres grupos de quinasas, conocido como cascadas de las MAPK, son importantes en la modulación de la función tras el reconocimiento de las señales por los receptores o sensores, para así convertir estas señales en respuestas de señalización eucariotas. *A. thaliana* es la planta modelo en la que se ha estudiado más en profundidad las rutas de las MAPK. Así, entre las MAPK más conocidas se encuentran la MPK3 y la MPK6 (subgrupo A), que están implicadas en la respuesta a distintos estreses bióticos y abióticos y en el crecimiento y desarrollo de la planta. Estas proteínas son ortólogas a SIPK y WIPK de tabaco. Otro grupo de MAPK, MPK4 y MPK11 (subgrupo B), regulan las respuestas de defensa frente a patógenos, las respuestas abióticas y juega un papel esencial en la división celular (Kosetsu *et al.*, 2010; Meng y Zhang, 2013). Entre las MAPKK mejor caracterizadas se encuentran MKK1 y MKK2 (subgrupo A), que activan a MPK4 en respuesta a patógenos, salinidad o frío. Otro grupo de estas quinasas son MKK4 y MKK5 (subgrupo C), que activan a MPK3 y MPK6 para regular el desarrollo de la planta y las respuestas de defensa. Incluso se ha observado que la activación de MPK6 a través de MKK3 (subgrupo B) está implicada en la regulación de la producción de ácido jasmónico (JA, del inglés, Jasmonic Acid) en *A. thaliana*.

En general, se han descrito dos rutas principales de MAPK involucradas en la defensa de la planta, aunque el efecto sobre la regulación de las respuestas de defensa por cada una de las rutas depende de la especie vegetal. Así, se ha establecido una de las vías como la interacción entre las quinasas MKK4/MKK5 y MPK3/MPK6 y, por el otro, la existencia de otra ruta comúnmente denominada MKK1-MKK2/2-MPK4. Ambas rutas regulan finalmente la actividad del factor de transcripción WRKY33, perteneciente a la familia de los reguladores WRKY, y que activa la transcripción de genes relacionados con la defensa. La quinasa MPK6 de *A. thaliana* y de *N. tabacum* regula positivamente las respuestas de defensa. Además, la quinasa MPK4 se considera un regulador negativo de la señalización mediante la producción de SA y ROS en las respuestas de defensa y como regulador positivo en el crecimiento y desarrollo de la planta en *A. thaliana* y en *G. max* (Liu *et al.*, 2011; 2014).

Numerosos receptores PRR activan la señalización por MAPK cuando éstos reconocen los PAMP o MAMP (PTI), como el receptor FLS2, que reconoce el péptido de 22 aminoácidos (flg22) procedente de la flagelina bacteriana (Gomez-Gomez y Boller, 2000), y el receptor EFR (del inglés, Elongation Factor EF-Tu Receptor), que reconoce al factor de elongación Tu (elf18) de bacterias. En *A. thaliana* los elicitores flg22 y elf18 tienen la capacidad de disparar una fuerte y transitoria activación de MPK3, MPK6, MPK4 y MPK11. Posteriormente, se describió que estas quinasas se activan también por la quitina de hongos y los peptidoglicanos de las bacterias, reconocidos por los receptores CERK1 y LYM1, respectivamente. Además, los estudios en tomate y en tabaco han revelado que la activación de las MAPK mediante la detección de los efectores de los patógenos por las proteínas R es un proceso esencial en la ETI, como ocurre con el efector Avr9 de hongos, que activa las MAPK SIPK y WIPK en plantas de tabaco transgénicas que expresan el gen de resistencia (*R*) Cf-9 (Oh y Martin, 2011). En *A. thaliana*, MPK3 y MPK6 también están implicadas en la ETI, ya que, por ejemplo, la presencia del efector AvrRpt2 de *P. syringae* dispara de forma prolongada la activación de estas dos MAPK (Underwood *et al.*, 2007). Sin embargo, también existen efectores que interfieren en la ruta de las MAPK. Este es el caso del efector YopJ de *Y. pestis*, homólogo a NopJ de *S. fredii* NGR234, que posee función cisteína proteasa y se ha determinado que inhibe la ruta de las MAPK del organismo hospedador (Freiberg *et al.*, 1997; Orth, 2002) Además, se trata de un efector Avr, ya que es reconocido por la célula eucariota, disparando la respuesta ETI, lo que parece

tener relación con el efecto altamente negativo que se produce sobre la nodulación cuando NopJ se encuentra presente. Por todo ello, NopJ podría ser también detectado por proteínas R de la célula eucariota (Yang *et al.*, 2010).

Incremento del calcio citosólico y producción de ROS.

Tanto en la PTI como en la ETI se genera un rápido incremento del calcio citosólico, disparándose de forma más intensa en el segundo caso. La acumulación de calcio se puede producir a través de la entrada de este ión al interior de la célula o por la salida de éste desde orgánulos de reserva, como el retículo endoplasmático o la vacuola. El reconocimiento de los rizobios por sus plantas hospedadoras también dispara un incremento intracelular del calcio, sin embargo, éste es crucial para el desarrollo y la formación del nódulo, por lo que deben existir mecanismos específicos que deriven la señalización por calcio hacia la activación del proceso de nodulación sin desencadenar las respuestas de defensa. Tras la acumulación de calcio se suelen generar ROS, como el ión superóxido o el peróxido de hidrógeno. La función de las ROS no solo es la de romper la pared celular del patógeno para así frenar su colonización, sino que también se requieren para la activación de la transcripción de numerosos genes de defensa (Wu *et al.*, 2014). En el caso de la relación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa, la acumulación del calcio citosólico y la producción de ROS (especialmente el peróxido de hidrógeno) forman parte del proceso de nodulación, aunque las ROS pueden actuar también como compuestos antimicrobianos para controlar las infecciones de los patógenos. La expresión de NopM de *S. fredii* NGR234 en células de tabaco inhibe la respuesta de defensa mediada por la producción de ROS, por lo que pueden existir mecanismos, como los efectores del T3SS, que modulen la intensidad de la respuestas a través de ROS (Xin *et al.*, 2012).

Balance hormonal.

El SA y el JA son importantes moléculas de señalización en la defensa de las plantas contra los patógenos biotrofos y necrotrofos, respectivamente (Glazebrook, 2005). Incluso, se ha determinado que la señalización entre el JA y el SA pueden comprometerse recíprocamente, por lo que en los tejidos vegetales normalmente se activa la señalización por JA o SA, pero no ambas al mismo tiempo (Grant y Jones,

2009). El JA, en solitario, activa las respuestas desencadenadas por heridas o por herbívoros, en cambio, si el JA y el ET se encuentran presentes al mismo tiempo, ambos actúan en las defensas contra los patógenos necrotrofos. Además, el ET se encuentra implicado en la activación de las respuestas de defensa contra algunos patógenos biotrofos y hemibiotrofos (Adie *et al.*, 2007), lo que pone de manifiesto que la compleja red de señalización hormonal involucrada en la defensa varía dependiendo del tipo de interacción patógeno-planta y, posiblemente, de la especie vegetal y bacteriana (o patógenos eucariotas). Debido a que el balance entre JA y SA determina si la planta sucumbe o no a la infección por un patógeno, algunos de los microorganismos han evolucionado con el fin de poder cambiar los niveles de hormonas en la planta para su propio beneficio, ya sea actuando directamente sobre ellas o indirectamente a través de la modulación de su producción, de su actividad o de la señalización de otras hormonas. Así, el efector XopD, homólogo a NopD de los rizobios, modula la transcripción de los genes del hospedador, reprimiendo la expresión de los genes responsables de la producción de SA y JA (Hotson *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2008).

En las leguminosas, las hormonas no solo juegan un papel importante en el crecimiento, desarrollo y defensa de la planta, sino que son esenciales en el proceso de la nodulación. El efecto negativo del SA sobre la nodulación ha sido documentado en multitud de trabajos y, de hecho, las leguminosas pueden responder a los rizobios no compatibles incrementando los niveles de SA (Martínez-Abarca *et al.*, 1998). Stacey *et al.* (2006) demostraron que las rutas de defensa mediadas por SA juegan un papel importante en el control de la formación del nódulo, tanto en leguminosas que forman nódulos determinados como en las que forman nódulos indeterminados.

Respuesta hipersensible o HR.

La HR es una muerte rápida de las células vegetales y se encuentra ligada a los mecanismos de muerte celular programada y al refuerzo de la pared celular vegetal. La HR se localiza en la zona de infección y tiene como fin restringir la colonización del patógeno, limitando, entre otras cosas, la cantidad de nutrientes disponibles. Esta respuesta es precedida por el aumento de los niveles de calcio que se da en el citoplasma de la célula infectada y la posterior producción de óxido nítrico (NO, del inglés, Nitric Oxide) y de ROS, lo que finalmente conlleva al incremento de la concentración de SA

local y la expresión de proteínas PR (**Delledone, 2005**). Además, estudios recientes han determinado que durante la HR en plantas de tomate se requiere una gran demanda energética y que los factores de transcripción WRKY son los reguladores más importantes de esta respuesta (**Etalo et al., 2013**). Aunque las respuestas de tipo HR suelen asociarse a la respuesta ETI, se ha documentado que la acumulación de ROS puede generar una HR en interacciones *Rhizobium*-leguminosa con el fin de evitar la entrada de un gran número de bacterias o de otras especies no compatibles (**Parniske et al., 1990; Santos et al., 2001; Vasse et al., 1993**).

Respuesta sistémica.

La señalización dependiente de SA no sólo es fundamental para establecer la resistencia local frente a la infección por los patógenos como ocurre durante la HR, sino que es también esencial para la resistencia sistémica. El mecanismo más extendido involucrado en la resistencia sistémica de las plantas es la resistencia sistémica adquirida o SAR, que se da en los tejidos alejados de la zona local de infección y que le confiere una mayor resistencia a la planta a futuras infecciones. Así, la infección local por un patógeno desencadena la producción de las señales inmunes móviles, como son el ácido metilsalicílico (MeSA, del inglés, Methyl Salicylic Acid), el ácido azelaico, el glicerol-3-fosfato (G3P) y las proteínas de transferencia de lípidos DIR1 y AZI1. Estas señales móviles son transportadas a través del sistema vascular hacia las zonas no infectadas y, mediante un mecanismo desconocido, inducen la acumulación de SA, que es la molécula señal necesaria para que se de la SAR. De esta forma, la acumulación de SA induce la secreción de las proteínas PR, con función antimicrobiana, en células de zonas no infectadas, y la metilación de las histonas y otras modificaciones de la cromatina, que prepara a los genes relacionados con la inmunidad para aumentar su expresión y establecer la memoria inmune, proceso que depende en gran medida del regulador transcripcional NPR1 (**Dong, 2004**). Este regulador transcripcional, además, reprime diversos genes implicados en procesos celulares básicos, como los responsables del proceso fotosintético, para así priorizar las respuestas del sistema inmune a costa del crecimiento de la planta, o la nodulación, en el caso de las relaciones simbióticas (**Peleg-Grossman et al., 2009; Sugano et al., 2010**).

Existe otro mecanismo de activación de la resistencia sistémica en plantas denominado respuesta sistémica inducida o ISR (del inglés, *Induced Systemic Resistance*) y, además, se ha probado que también protege de una posterior invasión de un agente patógeno. Este proceso, a diferencia de la SAR, puede ser independiente de SA y de la expresión de los genes *PR* y se suele desarrollar en respuesta a ciertas bacterias no patógenas o PGPR (del inglés, *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) (Van der Ent *et al.*, 2009; Van Wees *et al.*, 2008).

Kosslak y Bohlool (1984) observaron que la respuesta de defensa de la planta inducida por la infección con un rizobio se transmitía desde las raíces infectadas a las no infectadas, impidiendo una infección posterior. En la relación *Rhizobium*-leguminosa, el proceso de autorregulación de la nodulación o AON presenta ciertas similitudes con la ISR y la SAR, ya que, en todos los casos, la infección localizada en determinadas zonas de la planta (en los rizobios habitualmente localizada en la zona de los pelos emergentes de la raíz) desencadena una resistencia a posteriores infecciones en otras partes más alejadas de la planta (Durrant y Dong, 2004; Van Wees *et al.*, 2008; Vlot *et al.*, 2009). Existen evidencias que conectan la AON con la señalización de las respuestas de defensa, como la hipersensibilidad al ataque por patógenos o nematodos de numerosos mutantes afectados en la AON (Lohar y Bird, 2003; Tazawa *et al.*, 2007). Además, en la soja se ha demostrado que la expresión de un conjunto de genes *PR* se encuentra regulado por el receptor de la AON GmNARK (Kinkema y Gresshoff, 2008). Parece evidente que el mecanismo de la AON permite a las leguminosas mantener el balance simbiótico, suprimiendo la invasión bacteriana y la nodulación excesiva a través de la activación de las respuestas de defensa para mantener el balance entre los beneficios y los costes de esta relación mutualista.

Proteínas PR, proteínas relacionadas con la defensa.

Entre las proteínas PR se incluyen enzimas (como la β -1,3 glucanasa y la quitinasa) y defensinas, las cuales poseen potentes actividades antimicrobianas mediante la hidrólisis de la pared celular de los patógenos o la rotura de sus membranas, respectivamente. Su síntesis está inducida por distintas señales sistémicas inmunes, ya sea a través de una infección o, por ejemplo, por el incremento de SA en ausencia de un patógeno. Además, se requiere la regulación de un gran número de proteínas del retículo

endoplasmático para asegurar el plegamiento, el transporte y la secreción de estas proteínas PR (Spoel y Dong, 2012). Existen 14 clases de proteínas PR (PR1-PR14) en las plantas. Sin embargo, el conjunto de proteínas PR que se expresa en una determinada planta varía dependiendo del patógeno y de la molécula señal. En general, la expresión de los genes *PR* de *G. max*, *GmPR1* y *GmPR5*, es dependiente de SA, mientras que la del gen *GmPR2* depende de ET y la del gen *GmPR3* de JA y, en menor medida de ET (Mazarei *et al.*, 2007). López-Baena *et al.* (2009) demostraron que un mutante de la estirpe HH103 de *S. fredii* incapaz de secretar efectores provoca el aumento de la expresión del gen de defensa *PR1* en las raíces y las hojas de plantas de *G. max*, indicando que el conjunto de MAMP de esta estirpe es capaz de activar las respuestas de defensa de la planta de forma sistémica y que el T3SS es responsable de la supresión de estas respuestas. Además, el efector NopL de *S. fredii* NGR234 parece suprimir la expresión de proteínas PR en tabaco, indicando que ciertos efectores rizobianos pueden intervenir en la supresión de las respuestas defensivas de la planta (Bartsev *et al.*, 2004).

Material y Métodos

1. Material y Métodos relacionados con bacterias.

1. 1. Estirpes bacterianas y agentes selectivos e identificativos.

1. 1. 1. Estirpes bacterianas.

Las estirpes utilizadas en esta Tesis se recogen en la **Tabla 4 (A, B, C y D)**.

Tabla 4 (A). Estirpes derivadas de *Sinorhizobium fredii* HH103 utilizadas en esta Tesis.

<i>Sinorhizobium fredii</i>		
Estirpe	Características relevantes	Referencia
SVQ269	Estirpe silvestre HH103, Rif ^R	Madinabeitia et al., 2002
SVQ269 (pMUS1199)	SVQ269 con el plásmido pMP92 que porta un fragmento de ~3,3 kb que contiene los genes <i>luxCDABE</i> de <i>Vibrio fischeri</i> proveniente del vector FLUX, Rif ^R , Tc ^R	Esta Tesis
SVQ269 (pMUS1207)	SVQ269 con el plásmido pMP92 que porta la caja <i>tts</i> de la región promotora del operón <i>nopC-nopA</i> de <i>S. fredii</i> HH103 seguida de los genes <i>luxCDABE</i> de <i>V. fischeri</i> , Rif ^R , Tc ^R	Esta Tesis
SVQ533	SVQ269 <i>ttsI::Ω</i> , Rif ^R , Spc ^R	López-Baena, 2008
SVQ533 (pMUS984)	SVQ533 con el plásmido pMP92 que porta los genes del operón <i>ttsI-y4xK-rhcC2</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Rif ^R , Spc ^R , Tc ^R	López-Baena, 2008
SVQ533 (pMUS1207)	SVQ533 con el plásmido pPM92 que porta la caja <i>tts</i> del operón <i>nopC-nopA</i> de <i>S. fredii</i> HH103 seguido de los genes <i>luxCDABE</i> de <i>V. fischeri</i> , Rif ^R , Tc ^R	Esta Tesis
SVQ288	HH103-1 <i>rhcJ::Tn5-lacZ</i> , Str ^R , Km ^R	de Lyra et al., 2006
SVQ116	HH103-1 <i>nodA::Tn5-lacZ</i> , Rif ^R , Str ^R , Km ^R	Buendía-Clavería et al., 2003

Tabla 4 (A). Estirpes derivadas de *Sinorhizobium fredii* HH103 utilizadas en esta Tesis.

Estirpe	Características relevantes	Referencia
SVQ116 (pMUS741)	SVQ116 con el plásmido pMP92 que porta el gen <i>ttsI</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Str ^R , Km ^R Tc ^R	Esta Tesis
SVQ318	SVQ269 <i>nodD1::Ω</i> , Rif ^R , Spc ^R	Vinardell <i>et al.</i> , 2004
SVQ318 (pMUS741)	SVQ318 con el plásmido pMP92 que porta el gen <i>ttsI</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Rif ^R , Spc ^R , Tc ^R	Cedido por el Dr. López- Baena
SVQ502	SVQ269 <i>nodD1::lacZ-Gm^R</i> , Rif ^R , Spc ^R	Vinardell <i>et al.</i> , 2004
SVQ502 (pMUS1207)	SVQ502 con el plásmido pPM92 que porta la caja <i>tts</i> del operón <i>nopC-nopA</i> de <i>S. fredii</i> HH103 seguido de los genes <i>luxCDABE</i> de <i>V. fischeri</i> , Rif ^R , Spc ^R , Tc ^R	Esta Tesis
SVQ715	SVQ269 <i>nopCΔ</i> , Rif ^R	Esta Tesis
SVQ715 (pMUS986)	SVQ715 con el plásmido pMP92 que porta los genes del operón <i>nopC-nopA</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Rif ^R , Tc ^R	Esta Tesis
SVQ743	SVQ269 con el plásmido pK18 <i>mob</i> que porta un fragmento de ~1,5 kb, procedente de pMUS1290, que contiene la fusión <i>nopC-cya</i> clonada en el punto <i>EcoRI/BamHI</i> , Rif ^R , Km ^R	Esta Tesis
SVQ744	SVQ533 con el plásmido pK18 <i>mob</i> que porta un fragmento de ~1,5 kb, procedente de pMUS1290, que contiene la fusión <i>nopC-cya</i> clonada en el punto <i>EcoRI/BamHI</i> , Rif ^R , Km ^R	Esta Tesis
SVQ695	SVQ269 <i>nopD::Ω</i> , Rif ^R , Spc ^R	Esta Tesis
SVQ695 (pMUS1213)	SVQ695 con el plásmido pBBR1 MCS-5 que porta el gen <i>nopD</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Rif ^R , Spc ^R , Gm ^R	Esta Tesis
SVQ707	SVQ269 <i>nopIΔ</i> , Rif ^R	Esta Tesis
SVQ707 (pMUS1215)	SVQ707 con el plásmido pMP92 que porta el gen <i>nopI</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Rif ^R , Tc ^R	Esta Tesis

Tabla 4 (A). Estirpes derivadas de *Sinorhizobium fredii* HH103 utilizadas en esta Tesis.

Estirpe	Características relevantes	Referencia
SVQ694	SVQ269 <i>nopL</i> :: Ω , Rif ^R , Spc ^R	Esta Tesis
SVQ694 (pMUS1191)	SVQ694 con el plásmido pMP92 que porta el gen <i>nopL</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Rif ^R , Spc ^R , Tc ^R	Esta Tesis
SVQ745	SVQ269 con el plásmido pK18 <i>mob</i> que porta un fragmento de ~2,2 kb, procedente de pMUS1259, que contiene la fusión <i>nopL-cya</i> clonada en el punto <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III, Rif ^R , Km ^R	Esta Tesis
SVQ746	SVQ533 con el plásmido pK18 <i>mob</i> que porta un fragmento de ~2,2 kb, procedente de pMUS1259, que contiene la fusión <i>nopL-cya</i> clonada en el punto <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III, Rif ^R , Km ^R	Esta Tesis
SVQ559	SVQ269 <i>nopP</i> :: <i>lacZ</i> -Gm ^R , Rif ^R , Gm ^R	López-Baena et al., 2009
SVQ559 (pMUS983)	SVQ559 con el plásmido pMP92 que porta el gen <i>nopP</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Rif ^R , Gm ^R , Tc ^R	López-Baena et al., 2009
SVQ708	SVQ269 <i>nopP</i> :: <i>lacZ</i> -Gm ^R , <i>nopL</i> :: Ω , Rif ^R , Gm ^R , Spc ^R	Esta Tesis
SVQ729	SVQ269 <i>nopI</i> Δ , <i>nopL</i> :: Ω , Rif ^R , Spc ^R	Esta Tesis
SVQ711	SVQ269 <i>nopI</i> Δ , <i>nopP</i> :: <i>lacZ</i> -Gm ^R , Rif ^R , Gm ^R	Esta Tesis
SVQ716	SVQ269 <i>nopI</i> Δ , <i>nopP</i> :: <i>lacZ</i> -Gm ^R , <i>nopL</i> :: Ω , Rif ^R , Gm ^R , Spc ^R	Esta Tesis
SVQ691	SVQ269 <i>nopT</i> :: Ω , Rif ^R , Spc ^R	Esta Tesis
SVQ691 (pMUS1214)	SVQ691 con el plásmido pMP92 que porta el gen <i>nopT</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Rif ^R , Spc ^R , Tc ^R	Esta Tesis

Tabla 4 (B). Estirpes derivadas de *Agrobacterium tumefaciens* CV3101 utilizadas en esta Tesis.

<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
CV3101	Estirpe silvestre, Rif ^R	Rotino y Gleddie, 1990
Estirpe	Características relevantes	Referencia
CV3101 (pEG100)	CV3101 con el vector de transformación en plantas pEG100 que no expresa la proteína YFP ni el epitopo HA. Contiene el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, Rif ^R , Km ^R	Cedido por la Dra. Ma
CV3101 (pEG104)	CV3101 con el vector de transformación en plantas pEG104 que expresa la proteína YFP. Contiene el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, Rif ^R , Km ^R	Cedido por la Dra. Ma
CV3101 (pMUS1253)	CV3101 con el plásmido pEG101 que porta el gen <i>nopI</i> de <i>S. fredii</i> HH103, clonado a través del sistema Gateway (Invitrogen). Contiene los genes que codifican la YFP y el epitopo HA, Rif ^R , Km ^R	Esta Tesis
CV3101 (pMUS1250)	CV3101 con el plásmido pEG101 que porta el gen <i>nopL</i> de <i>S. fredii</i> HH103, clonado a través del sistema Gateway (Invitrogen). Contiene los genes que codifican la YFP y el epitopo HA, Rif ^R , Km ^R	Esta Tesis
CV3101 (pMUS1252)	CV3101 con el plásmido pEG101 que porta el gen <i>nopP</i> de <i>S. fredii</i> HH103, clonado a través del sistema Gateway (Invitrogen). Contiene los genes que codifican la YFP y el epitopo HA, Rif ^R , Km ^R	Esta Tesis

* Epitopo HA (del inglés, Human influenza hemagglutinin): se utiliza para marcar en el extremo amino o carboxilo terminal de una determinada proteína, para ser analizada mediante métodos inmunológicos. El epitopo HA está definido por la secuencia de aminoácidos YPYDVPDYA.

Tabla 4 (C). Estirpes derivadas de *Escherichia coli* utilizadas en esta Tesis.

<i>Escherichia coli</i>		
Estirpe	Características relevantes	Referencia
DH5 α	<i>SupE44, ΔlacU169, 5hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1, Nx^R</i>	Sambrook et al., 1989
DH5 α (pAB2001)	Plásmido que contiene el cassette <i>lacZ-Gm^R, Ap^R, Gm^R</i>	Becker et al., 1995
DH5 α (pGEM-T Easy)	Vector de clonación de productos de PCR, Ap ^R	Promega (EEUU)
DH5 α (pHP45 Ω)	Plásmido que contiene el interposón Ω , Spc ^R /Str ^R , Ap ^R	Prentki y Krisch, 1984
DH5 α (pK18 <i>mob</i>)	Vector de clonación suicida en los rizobios, Km ^R	Schäfer et al., 1994
DH5 α (pK18 <i>mobsac</i>)	Vector de clonación que contiene el gen de sensibilidad a la sacarosa. Suicida en los rizobios, Km ^R	Schäfer et al., 1994
DH5 α (pMP92)	Vector de clonación de amplio rango de hospedador IncP, Tc ^R	Spaink et al., 1987
DH5 α (pRK2013)	Plásmido coadyuvante, Km ^R	Figurski y Helinski, 1979
DH5 α (pMBL-T)	Vector de clonación de productos de PCR, Ap ^R	Dominion-MBL (España)
DH5 α (pBBR1 MCS-5)	Vector de clonación de amplio rango de hospedador, Gm ^R	Kovach et al., 1995
DH5 α (pBluescript II SK (+/-) phagemid)	Vector de clonación de productos de PCR, Ap ^R	Stratagene (EEUU)
DH5 α (pGEX 4T-1)	Vector de expresión en bacterias de proteínas de fusión a la GST, Ap ^R	GE Healthcare (Inglaterra)

Tabla 4 (C). Estirpes derivadas de *Escherichia coli* utilizadas en esta Tesis.

Estirpe	Características relevantes	Referencia
DH5α (pGML10)	Vector de expresión en <i>S. cerevisiae</i> . Contiene el epitopo Myc, Ap ^R	BioTechniques (EEUU)
DH5α (FLUX)	Vector que contiene los genes <i>luxCDABE</i> de <i>V. fischeri</i>	Cedido por el Dr. Cámara
DH5α (pMUS1205)	Plásmido pGEM-T Easy que porta un fragmento de PCR de ~0,3 kb que contiene la caja <i>tts</i> del operón <i>nopC-nopA</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Ap ^R	Esta Tesis
DH5α (pMUS1199)	Plásmido pMP92 que porta un fragmento de ~3,3 kb que contiene los genes <i>luxABCDEF</i> proveniente del vector FLUX, Tc ^R	Esta Tesis
DH5α (pMUS1207)	Plásmido pMUS1199 que porta un fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> proveniente de pMUS1205 de ~0,3 kb que contiene la caja <i>tts</i> del operón <i>nopC-nopA</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Tc ^R	Esta Tesis
Construcciones que portan el gen <i>nopC</i>		
DH5α (pMUS1163)	Plásmido pGEM-T Easy que porta un fragmento de PCR de ~1,1 kb con dianas <i>BamHI</i> y <i>HindIII</i> en los extremos y que contiene el gen <i>nopC</i> deleciónado de <i>S. fredii</i> HH103, Ap ^R	Esta Tesis
DH5α (pMUS1192)	Plásmido pK18 <i>mobsac</i> que porta un fragmento <i>BamHI/HindIII</i> de ~1,1 kb procedente de pMUS1163 que contiene el gen <i>nopC</i> deleciónado de <i>S. fredii</i> HH103, Km ^R	Esta Tesis
DH5α (pMUS986)	Plásmido pMP92 que porta los genes <i>nopC</i> y <i>nopA</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Tc ^R	López-Baena, 2008
DH5α (pMUS1239)	Plásmido pDONR207 que porta un fragmento de ~0,3 kb que contiene el gen <i>nopC</i> de <i>S. fredii</i> HH103 sin codón de stop clonado a través del sistema Gateway (Invitrogen), Gm ^R	Esta tesis
DH5α (pMUS1290)	Plásmido pLMS150 que porta un fragmento de ~0,3 kb que contiene el gen <i>nopC</i> de <i>S. fredii</i> HH103 sin codón de stop a partir de pMUS1239 clonado a través del sistema Gateway (Invitrogen), Tc ^R	Esta tesis
DH5α (pMUS1291)	Plásmido pK18 <i>mob</i> que porta un fragmento de ~1,5 kb que contiene la fusión <i>nopC-cya</i> clonada en el punto <i>EcoRI/BamHI</i> , Km ^R	Esta Tesis

Tabla 4 (C). Estirpes derivadas de *Escherichia coli* utilizadas en esta Tesis.

Estirpe	Características relevantes	Referencia
DH5 α (pMUS1186)	Plásmido pGML10 que porta un fragmento <i>XbaI/KpnI</i> de ~0,3 kb que contiene el gen <i>nopC</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Ap ^R	Esta tesis
Construcciones que portan el gen <i>nopI</i>		
(DH5 α) pMUS1165	Plásmido pGEM-T Easy que porta un fragmento de PCR de ~0,9 kb con dianas para <i>BamHI</i> y <i>HindIII</i> que contiene el gen <i>nopI</i> delecionado de <i>S. fredii</i> HH103, Ap ^R	Esta Tesis
(DH5 α) pMUS1171	Plásmido pK18 <i>mobsac</i> que porta un fragmento <i>EcoRI</i> de ~0,9 kb procedente de pMUS1165 que contiene el gen <i>nopI</i> delecionado de <i>S. fredii</i> HH103, Km ^R	Esta Tesis
(DH5 α) pMUS1127	Plásmido pGEM-T Easy que porta un fragmento de PCR de ~1,7 kb que contiene el gen <i>nopI</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Ap ^R	Esta Tesis
(DH5 α) pMUS1215	Plásmido pMP92 que porta un fragmento <i>EcoRI</i> de ~1,7 kb procedente de pMUS1127 que contiene el gen <i>nopI</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Tc ^R	Esta Tesis
(DH5 α) pMUS1245	Plásmido pDONR207 que porta un fragmento de ~0,85 kb que contiene el gen <i>nopI</i> de <i>S. fredii</i> HH103 sin codón de stop clonado a través del sistema Gateway (Invitrogen), Gm ^R	Esta Tesis
(DH5 α) pMUS1253	Plásmido pEG101 que porta un fragmento de ~0,85 kb que contiene el gen <i>nopI</i> de <i>S. fredii</i> HH103 clonado a través del sistema Gateway a partir de pMUS1245, Km ^R	Esta Tesis
Construcciones que portan el gen <i>nopL</i>		
DH5 α (pMUS1007)	Plásmido pK18 <i>mob</i> que porta un fragmento de ~1,1 kb que contiene el gen <i>nopL</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Km ^R	Cedido por la Dra. Cubo
DH5 α (pMUS1095)	Plásmido pMUS1007 con el interposón Ω inserto en el punto <i>EcoRV</i> situado en el gen <i>nopL</i> , Km ^R , Spc ^R	Esta Tesis
DH5 α (pMUS1145)	Plásmido pMBL que porta un fragmento de PCR de ~2,2 kb que contiene el gen <i>nopL</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Ap ^R	Esta Tesis
DH5 α (pMUS1191)	Plásmido pMP92 que porta un fragmento <i>BamHI/HindIII</i> de 2,2 ~kb procedente de pMUS1145 que contiene el gen <i>nopL</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Tc ^R	Esta Tesis

Tabla 4 (C). Estirpes derivadas de *Escherichia coli* utilizadas en esta Tesis.

Estirpe	Características relevantes	Referencia
DH5 α (pMUS1243)	Plásmido pDONR207 que porta un fragmento de ~1,1 kb que contiene el gen <i>nopL</i> de <i>S. fredii</i> HH103 sin codón de stop, clonado a través del sistema Gateway (Invitrogen), Gm ^R	Esta Tesis
DH5 α (pMUS1250)	Plásmido pEG101 que porta el gen <i>nopL</i> de HH103 clonado a través del sistema Gateway (Invitrogen), Rif ^R , Km ^R	Esta Tesis
DH5 α (pMUS1259)	Plásmido pLMS150 que porta un fragmento de ~1,1 kb que contiene el gen <i>nopL</i> de <i>S. fredii</i> HH103 sin codón de stop a partir de pMUS1243 clonado a través del sistema Gateway (Invitrogen), Tc ^R	Esta tesis
DH5 α (pMUS1294)	Plásmido pK18 <i>mob</i> que porta un fragmento de ~2,2 kb que contiene la fusión <i>nopL-cya</i> clonada en el punto <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III, proveniente de la amplificación por PCR a partir de pMUS1259, Km ^R	Esta Tesis
DH5 α (pMUS1183)	Plásmido pGML10 que porta un fragmento <i>Xba</i> I/ <i>Kpn</i> I de ~1,1 kb procedente de pMUS1180 que contiene el gen <i>nopL</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Ap ^R	Esta Tesis
Construcciones que portan el gen <i>nopP</i>		
DH5 α (pMUS1149)	Plásmido pDONR207 que porta un fragmento de ~0,8 kb que contiene el gen <i>nopP</i> de <i>S. fredii</i> HH103 clonado a través del sistema Gateway (Invitrogen), Gm ^R	Esta Tesis
DH5 α (pMUS1157)	Plásmido pGEX KG que porta un fragmento de ~0,8 kb que contiene el gen <i>nopP</i> de <i>S. fredii</i> HH103 clonado a través del sistema Gateway (Invitrogen) a partir de pMUS1149, Ap ^R	Esta Tesis
DH5 α (pMUS1238)	Plásmido pDONR207 que porta un fragmento de ~0,8 kb que contiene el gen <i>nopP</i> de <i>S. fredii</i> HH103, sin codón de stop, clonado a través del sistema Gateway (Invitrogen), Gm ^R	Esta Tesis
DH5 α (pMUS1252)	Plásmido pEG101 que porta un fragmento de ~0,8 kb que contiene el gen <i>nopP</i> de <i>S. fredii</i> HH103 clonado a través del sistema Gateway (Invitrogen) a partir de pMUS1238, Km ^R	Esta Tesis

Tabla 4 (C). Estirpes derivadas de *Escherichia coli* utilizadas en esta Tesis.

Estirpe	Características relevantes	Referencia
DH5 α (pMUS1184)	Plásmido pGML10 que porta un fragmento <i>XbaI/KpnI</i> de ~0,8 kb que contiene el gen <i>nopP</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Ap ^R	Esta tesis

* El epitopo Myc se utiliza para el marcaje de proteínas. Los anticuerpos anti c-Myc reconocen proteínas sobreexpresadas que están marcadas con el epitopo en su extremo amino o carboxilo terminal. Este epitopo se encuentra definido por la secuencia de aminoácidos EQKLISEEDL.

<i>Escherichia coli</i>		
Plásmido	Características relevantes	Referencia
BL21	<i>fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] AhsdS</i>	Studier y Moffatt, 1986
BL21 (pGEX 4T-1)	Vector de expresión en bacterias de genes fusionados al gen <i>gst</i> , Ap ^R	Amersham (Reino Unido)
BL21 (pMUS1135)	Plásmido pGEX 4T-1 que porta un fragmento <i>BamHI/EcoRI</i> de ~1,1 kb que contiene el gen <i>nopL</i> de <i>S. fredii</i> HH103	Esta Tesis
BL21 (pMUS1157)	Plásmido pGEX KG que porta un fragmento de ~0,8 kb que contiene el gen <i>nopP</i> de <i>S. fredii</i> HH103 clonado a través del sistema Gateway (Invitrogen) a partir de pMUS1149, Ap ^R	Esta Tesis
BL21 (pMUS1261)	Plásmido pGEX KG que porta un fragmento de ~0,85 kb que contiene el gen <i>nopI</i> de <i>S. fredii</i> HH103 clonado a través del sistema Gateway (Invitrogen) a partir de pMUS1148, Ap ^R	Esta Tesis
BL21 (pMUS1263)	Plásmido pGEX KG que porta un fragmento de ~0,16 kb que contiene la secuencia amino terminal previa a la secuencia aminoacídica EPPIYE del gen <i>nopI</i> de <i>S. fredii</i> HH103 clonado a través del sistema Gateway (Invitrogen), Ap ^R	Esta Tesis
BL21 (pMUS1296)	Plásmido pGEX KG que porta un fragmento de ~0,7 kb que contiene la secuencia de ADN correspondiente a la secuencia carboxilo terminal situada tras la secuencia aminoacídica EPPIYE del gen <i>nopI</i> de <i>S. fredii</i> HH103, clonado a través del sistema Gateway (Invitrogen), Ap ^R	Esta Tesis

Tabla 4 (C). Estirpes derivadas de *Escherichia coli* utilizadas en esta Tesis.

<i>Escherichia coli</i>		
DB3.1	<i>F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r_B⁻, m_B⁻) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm^r) xyl5 Δleu mtl1</i>	Invitrogen (EEUU)
Plásmido	Características relevantes	Referencia
DB3.1 (pDONR207)	Plásmido de clonación primaria para la reacción BP del sistema Gateway, Gm ^R	Invitrogen (EEUU)
DB3.1 (pGEX KG)	Plásmido de destino para la clonación mediante la reacción LR del sistema Gateway (Invitrogen) para la expresión de proteínas de fusión a GST, Ap ^R	Cedido por el Dr. Monreal
DB3.1 (pEG100)	Vector de transformación en plantas a través de <i>Agrobacterium</i> . No expresa ni la YFP ni el epitopo HA. Contiene el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, Km ^R	Earley et al., 2006
DB3.1 (pEG101)	Vector de transformación en plantas a través de <i>Agrobacterium</i> para la expresión de proteínas de fusión a YFP y al epitopo HA. Contiene el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, Km ^R	Earley et al., 2006
DB3.1 (pEG104)	Vector de transformación en plantas a través de <i>Agrobacterium</i> para la expresión de proteínas de fusión a YFP. Contiene el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, Km ^R	Earley et al., 2006
DB3.1 (pLMS150)	Plásmido de destino para la clonación mediante la reacción LR del sistema Gateway (Invitrogen) para la expresión de proteínas de fusión a la adenilato ciclasa (Cya), Tc ^R	Cedido por la Dra. Schechter

Ap: ampicilina, Gm: gentamicina, Km: kanamicina, Nx: ácido nalidíxico, Spc: espectinomicina, Str: estreptomycin, Tc: tetraciclina, Rif: rifampicina

Tabla 4 (D). Otras estirpes utilizadas en esta Tesis.

Otras especies		
Especie	Estirpe	Referencia
<i>Acinetobacter</i> sp.	ADPWH_lux	Huang et al., 2006
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>		Fett y Sequeira (1981)

1. 1. 2. Agentes selectivos e identificativos y flavonoides.

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

Agente selectivo	Solución stock (mg mL ⁻¹)	<i>S. fredii</i> (µg mL ⁻¹)	<i>E. coli</i> (µg mL ⁻¹)	<i>A. tumefaciens</i> CV3101
Ampicilina (Ap)	100	-	100	-
Espectinomicina (Spc)	50	50	100	-
Gentamicina (Gm)	50	5-50	10	-
Kanamicina (Km)	30	60	30	50
Ácido nalidíxico (Nal)	10	10	20	-
Rifampicina (Rif)	25	50	25	50
Tetraciclina (Tc)	10	1-2	10	-
X-gal *	20	40	40	-
Sacarosa		12,5%		

*(5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido)

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 °C. El X-gal (Roche, Suiza) se disolvió en N, N-dimetilformamida (20 mg mL⁻¹) y también se conservó a -20 °C. La isoflavona genisteína (Sigma Aldrich, EEUU) se preparó a una concentración de 1 mg mL⁻¹ en etanol absoluto y se añadió a los cultivos para alcanzar una concentración final de aproximadamente 3,7 µM. La temperatura de almacenamiento fue de -20 °C.

1. 2. Medidas de pH, densidad óptica y solución de congelación.

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 (Farmacia LKB, Suecia) y el lector de placas Synergy HT (BioTek, EEUU). 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% (m/v) y de glicerol al 15% (v/v) que se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 °C). Las bacterias así preparadas se conservaron a -80 °C.

1. 3. Medios de cultivo.

1. 3. 1. Medios de cultivo para *Sinorhizobium*.

Las estirpes de *Sinorhizobium* se cultivaron en los medios que se detallan a continuación. Los cultivos líquidos se incubaron en agitación a 180 r.p.m.. Los medios se solidificaron, cuando fue necesario, añadiendo 20 g L⁻¹ de agar. En ambos casos la temperatura de incubación fue de 28 °C.

Medio TY (Behringer, 1974)

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

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 °C).

Medio YM (Vincent, 1970)

K ₂ HPO ₄	500 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200 mg
NaCl	100 mg
Extracto de levadura	400 mg
Manitol	10 g
H ₂ O 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 °C).

1. 3. 2. Medios de cultivo para *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* CV3101 y *Acinetobacter* sp. ADP1.

Para cultivar estas estirpes se utilizó el medio rico de Luria-Bertani (LB). Los cultivos líquidos se incubaron en agitación a 180 r.p.m.. Los medios se solidificaron, cuando fue necesario, añadiendo 20 g L⁻¹ de agar. En ambos casos la temperatura de incubación fue de 37 °C.

LB (Maniatis *et al.*, 1982)

Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
NaCl	5 g
H ₂ O 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 °C).

1. 4. Métodos relacionados con los ácidos nucleicos bacterianos.

1. 4. 1. Métodos de transferencia de ADN.

1. 4. 1. 1. Conjugación bacteriana.

Conjugación usando el plásmido pK18mob.

Se utilizó para transferir plásmidos desde distintas estirpes de *E. coli* a *Sinorhizobium* mediante la metodología descrita por **Simon (1984)**. Para ello, se mezclaron en un tubo eppendorf los siguientes volúmenes de cultivos: 800 µL del cultivo de la estirpe de *Sinorhizobium* receptora, 200 µL de un cultivo en fase logarítmica de la estirpe de *E. coli* donadora del plásmido y 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 11000 g. El sobrenadante se retiró con cuidado y las células se resuspendieron en 200 µL de agua destilada estéril, volviendo a centrifugar a 11000 g durante 2 minutos para retirar los restos de antibióticos. Seguidamente, se retiró el sobrenadante dejando alrededor de 75 µL para resuspender el pellet. Este pellet resuspendido se colocó en el centro de una placa con medio TY sin antibióticos. La placa se incubó a 28 °C 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. La construcción de los mutantes por delección mediante PCR solapante (**apartado 1. 4. 11. de Material y Métodos**) se llevó a cabo utilizando el plásmido pK18mobsac. Una vez conjugados los plásmidos con el protocolo descrito anteriormente, se seleccionaron las estirpes transconjugantes de *Sinorhizobium* que fueron sensibles a sacarosa y resistentes a kanamicina (simples recombinantes). Estas estirpes se inocularon en 5 mL del medio TY y se incubaron durante alrededor de 4 días en agitación a 28 °C. Transcurrido ese tiempo, se sembraron alícuotas de 100 µL, provenientes de diluciones seriadas del cultivo crecido, en placas de TY con sacarosa y éstas se incubaron a 28 °C. Una vez que las colonias resistentes a sacarosa crecieron, se picaron en placas de TY en presencia o ausencia de kanamicina. De esta forma se seleccionaron los dobles recombinantes, es decir, aquellos que presentaron resistencia a la sacarosa y sensibilidad a la kanamicina.

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

Obtención de células competentes de *E. coli*.

Se preinoculó una colonia de *E. coli* en 5 mL de medio LB, con los antibióticos adecuados, y se creció a 37 °C en agitación durante toda la noche. Posteriormente, se inocularon 2,5 mL del cultivo crecido en 200 mL de medio LB, con los mismos antibióticos y se incubó a 37 °C en agitación hasta que la densidad óptica a 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 °C. 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 °C. 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°C 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 °C). *No se esteriliza en el autoclave. 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 °C 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 °C en agitación durante una hora. Tras la incubación, la mezcla 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. Este pellet resuspendido se sembró en placas de medio LB con los antibióticos adecuados y se incubó a 37°C durante 24 horas.

1. 4. 1. 3. Transformación de *Agrobacterium*.

Obtención de células competentes de *Agrobacterium*.

Se preinoculó una colonia de *Agrobacterium* en 5 mL de medio LB con los antibióticos adecuados y se creció a 28 °C en agitación durante toda la noche. Posteriormente, se inoculó 1 mL del cultivo crecido en 100 mL de medio LB con los mismos antibióticos y se incubó a 28 °C en agitación hasta que la densidad óptica a 600 nm fue igual o superior a 0,5. Se dividió el cultivo en dos volúmenes de 50 mL y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, el cultivo se centrifugó a 4000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 10 mL de una solución fría de CaCl₂ a una concentración de 0,15 M. La mezcla se incubó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 4000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 1 mL de una solución fría de CaCl₂ a una concentración de 20 mM. Se repartieron alícuotas de 100 µL en tubos eppendorf, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

Transformación usando células competentes de *Agrobacterium*.

Las células de *Agrobacterium* competentes se descongelaron a 37 °C durante 5 minutos. Se añadió 1 µg de ADN plasmídico por cada 100 µL de células competentes, se mezcló y se incubó en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se incubó durante un minuto en nitrógeno líquido y se descongeló a 37 °C durante 5 minutos. Se añadió 1 mL de medio LB y se incubó a 28 °C en agitación 4-5 horas. Tras la incubación, se centrifugó durante 30 segundos a 10000 g y se descartó el sobrenadante, dejando aproximadamente 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 28 °C durante 2 ó 3 días.

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 (solución TE sin ARNasa) 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 °C. 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 del tubo durante un minuto 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 añadieron 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 0,8 volúmenes de isopropanol, se mezcló suavemente y se dejó precipitar a -80 °C durante 20 minutos. Seguidamente, 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 a 4 °C. Finalmente, se dejó secar al precipitado de ADN a temperatura ambiente durante 30-40 minutos y se resuspendió en 100 µL de tampón TER.

Solución empleada

TER	Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM, pH 8, 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 también por inversión del tubo, 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 una 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 °C durante al 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% (m/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), GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma, EEUU) y, en el caso de necesitar un gran volumen, se usó el Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Suiza) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

1. 4. 4. Restricción del ADN.

Se utilizaron las endonucleasas de restricción suministradas por Roche (Suiza) y NewEngland 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. 5. Electroforesis del ADN.

Se llevó a cabo en geles de agarosa a una concentración de entre el 0,6% y el 1,5% (m/v) en tampón TAE 0,5X, preteñidos con bromuro de etidio, dependiendo del peso molecular de los fragmentos que se quisieron separar (**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 *HindIII*. La electroforesis se llevó a cabo utilizando el aparato Mupid-One (Advance, Japón) a 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).

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% (m/v), xileno cianol FF 0,25% (m/v), glicerol 30% (v/v)

1. 4. 6. 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 y el ADN se purificó mediante el kit Nucleo Spin Extract (Macherey-Nagel, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

1. 4. 7. Desfosforilación del ADN.

Tras la restricción de un vector, se añadió a la mezcla de reacción la enzima fosfatasa alcalina (Roche, Suiza) y se incubó la reacción durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, se inactivó la enzima incubando la mezcla durante 15 minutos a 65 °C. Finalmente, la muestra se fenolizó y el ADN se precipitó con etanol absoluto.

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 (dNTPs). Para ello, tras la digestión del ADN con la enzima adecuada en un volumen final de 20 μ L, se añadió 1 μ L de una solución de dNTPs a una concentración de 1 mM y 1 unidad de la enzima Klenow. La reacción se incubó durante 15-20 minutos a 37 °C. Posteriormente, se inactivaron las enzimas presentes en la reacción calentando a 75 °C durante 10 minutos o mediante fenolización.

Si la enzima de restricción producía extremos 3' monocatenarios, se realizó un tratamiento similar pero utilizando la ADN polimerasa del bacteriófago T4 que tiene actividad exonucleasa. 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 dNTPs a una concentración de 2 mM y 1-2 unidades de polimerasa T4. La reacción se incubó durante 15 minutos a 12 °C. Posteriormente, se inactivaron las enzimas presentes en la reacción calentando a 75 °C 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) de la ligasa 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)** con ciertas modificaciones. Los programas usados en cada caso siguen el siguiente esquema común:

1. Desnaturalización del ADN a 95 °C durante 5 minutos.
2. Desnaturalización del ADN a 95 °C durante 30 segundos.
3. Unión de los cebadores al ADN de cadena simple a la temperatura recomendada por el fabricante (IDT Corporation, EEUU) durante 30 segundos.
4. Polimerización del ADN a 72 °C, variando el tiempo de polimerización en función del tamaño del 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 °C durante 5 minutos.

El volumen de la mezcla de reacción varió dependiendo del experimento. Como norma general, 20 μL de mezcla de reacción contenían los cebadores adecuados a una

concentración de 0,2 μ M, dNTPs 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 (**Tablas 5 y 6**) se diseñaron con una longitud de alrededor de 20 pb, excepto los usados para clonaciones a través del sistema Gateway (Invitrogen) y para la delección de genes mediante PCR solapante, que fueron de mayor longitud. En todos los casos, éstos fueron diseñados manualmente o utilizando el programa informático GeneFisher 1.22 (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/>), teniendo en cuenta las siguientes características:

- a. El porcentaje de G + C estuviera comprendido entre 55-65%.
- b. La temperatura de fusión (T_m) estuviera comprendida entre 55-65 °C.
- c. El no auto apareamiento de los cebadores.

Tabla 5. Cebadores utilizados en esta Tesis para amplificar fragmentos de ADN destinados para clonación.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	pb	Tm (°C)
Omegaint-F	GCGAGGGCTTTACTAAGCTGA	21	57
Omegaint-R	GGGCCTTGATGTTACCCGAGA	21	59,1
ttsboxC_F	AAAAAGCTTCAACTGCACACGTTAGCGTT	29	61,4
ttsboxC_R	AAAGAATTCCAGCTACTCCTGCCTTAGCG	29	61,7
cya_XbaI	ATATCTAGATCAGCTGTCATAGCCGGAAT	29	62
cya_BamHI	ATAGGATCCTCAGCTGTCATAGCCGGAAT	29	62
nopCattB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TAATGGTCCGAGTGATTGGA	49	67,8
nopCattB2sinstop	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT AGGCATCCTCTTCAGTTTC	48	68,3
nopC_EcoRI	AAAGAATTCATGGTCCGAGTGATTGGAAG	29	58,9
nopP_pGML_F	AAATCTAGAATGTACGGTTCGAATTGATAG	29	54,8
nopP_pGML_R	AAAGGTACCTCACATGAAGTCATCTTCGT	29	59,3
attB1nopP	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TAATGTACGGTTCGAATTGAT	49	66,2
attB2nopP	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT ATCACATGAAGTCATCTTC	48	66,6
nopPattB2sinstop-1	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT ACATGAAGTCATCTTCGAT	48	67,1
nopIattb1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TAATGTATAGCAGTATCACT	49	65
nopIattB2ns	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT AGTCGGCCGGTCTCCGCG	48	73,2
nopL_pGML_F	AAATCTAGAATGGATATCAATTCAACCCG	29	55,3
nopL_pGML_R	AAAGGTACCAATGTCAAATCCAGCGATG	29	59,4
attB1NopL	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TAATGGATATCAATTCAACC	49	64,9
attB2NopL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT ATCAAATGTCAAATCCAG	48	66,3

Tabla 5. Cebadores utilizados en esta Tesis para amplificar fragmentos de ADN destinados para clonación.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	pb	Tm (°C)
nopLattB2sinstop	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	48	67,9
	AAATGTCAAATCCAGCGA		
nopLF	GTTGTCTCTATCATCATGGA	20	47,5
nopLR	AACGCCTACTCTGCAGGAAA	20	57,0
nopLext-F	CGACGCGACGTTTCGAGCGAA	20	62,2
nopLext-R	CGGCATCTCCAAGCAGGGAGA	21	61,6
nopLEX-F	TTAGGATCCGATATCAATTCAACCCGC	27	58,5
nopLEX-R	AACGAATTCTCAAATGTCAAATCCAGC	28	56,7
nopL_HindIII (F)	AAAAAGCTTATGGATATCAATTCAACCCG	29	55
nopCattB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	49	67,8
	TAATGGTCGGAGTGATTGGA		
nopCattB2sinstop	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	48	68,3
	AGGCATCCTCTTCAGTTTC		
nopC_EcoRI (F)	AAAGAATTCATGGTCGGAGTGATTGGAAG	29	59
nopDok-F	CCCCCTTTATTCCCAGGA	18	55,5
nopDok-R	TAACCTTCCAAGAGGACCA	19	51,8
nopDB-F	GAAAACCTGGCAGTCGGCCAGA	21	60,1
nopDB-R	CTGCCTCTTCGCTGGCCTCA	20	62,3
nopTFor	ACATCATTCTCGGTCAGGA	19	51,6
nopTRer	GACGAGGATTTACGTGGA	18	50,1
nopTHH_extF	CAGGAGATCGCCAAGAATTG	20	53,6
nopTHH_extR	ACGAGGATTTACGTGGACTT	20	53,6

1. 4. 11. Mutagénesis *in vitro* por delección mediante PCR solapante.

Esta técnica está basada en el método de **Griffits y Long (2008)**. Se realizaron los siguientes pasos de amplificación por PCR (**Figura 8**):

1.- Amplificación de fragmentos de entre 500 a 700 pb de longitud de las regiones flanqueantes al gen que se desea mutagenizar. Para ello, se añadió en un volumen de 20 μ L: 10 ng de ADN genómico, 0,2 μ M de cada cebador [cebadores 1 y 2 para la PCR de la región flanqueante derecha y cebadores 3 y 4 para la PCR de la región flanqueante izquierda (**Tabla 6**)], 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 μ L de reacción se le añadió una concentración de 2 ng de cada fragmento de ADN molde, 0,2 μ M de los cebadores 1 y 4, 0,2 mM de dNTP y 0,1 U de la polimerasa. En algunos casos la 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 descrito anteriormente.

Los cebadores 1 y 4 poseen dianas de restricción para *Bam*HI y *Hind*III, respectivamente. Por lo tanto, el amplicón obtenido en este último paso contenía las regiones flanqueantes al gen delecionado y las dianas para *Bam*HI y *Hind*III. Este fragmento se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III y se clonó en el plásmido pK18*mobsac* para su posterior transformación en *E. coli* y conjugación con la estirpe parental *S. fredii* HH103 Rif^R. Finalmente, se obtuvo la estirpe mutada por delección mediante doble recombinación y selección en medio suplementado con la concentración de sacarosa adecuada.

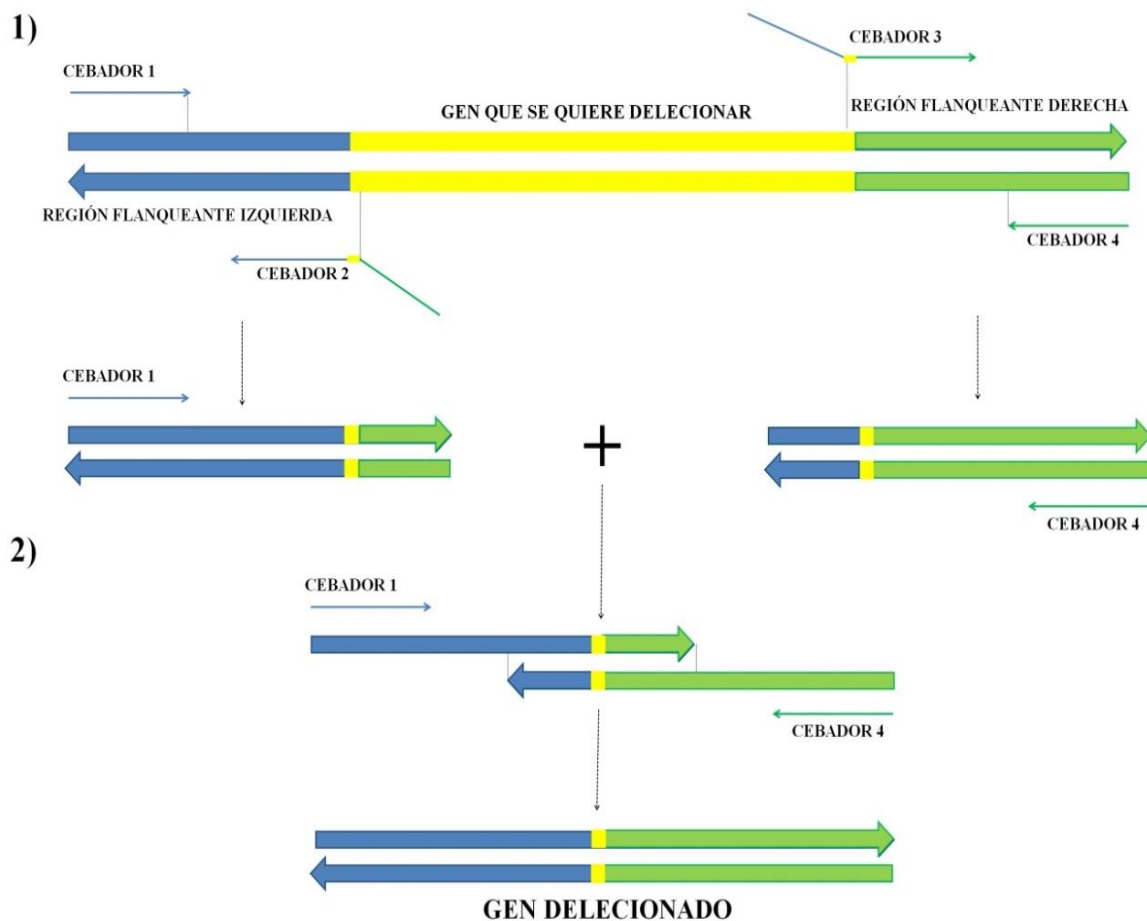


Figura 8. Esquema de la mutagénesis *in vitro* por deleción mediante PCR solapante. La homología entre los cebadores y el ADN molde se indica mediante el mismo color.

Tabla 6. 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	T _m (°C)
nopC-1	ATTAAGCTTTGTCATGGACAGGGAACGAA	29	60,1
nopC-2	CAGTTTCTGCCATAACCACTTCCAATCAC	28	59,6
nopC-3	GTGATTGGAAGTGGTATGGCAGAACTG	28	59,6
nopC-4	AAAGGATCCGCGAAATGGCGTCGTTCACT	29	65,3
nopI-1	ATTAAGCTTTCTTCGTCTCGCTGATCTCG	29	60
nopI-2	CTGGACGAATCTGTTGATCCAGTGATAC	28	58,6
nopI-3	GTATCACTGGATCAACAGATTCGTCCAG	28	58,6
nopI-4	AAAGGATCCTTGCAGCGTAAATCACGACG	29	62,4

1. 4. 12. Hibridación ADN:ADN.

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 enzimoimmunoensayo. Para ello se utilizó un anticuerpo conjugado (anti-digoxigenina 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, inmediatamente después de la electroforesis, el gel 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 15 horas en presencia del tampón de transferencia alcalino. Transcurrido ese tiempo, los filtros se lavaron en SSC 2X durante 5 minutos. Finalmente, el ADN se fijó al filtro por exposición a la luz ultravioleta durante 2 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 dNTPs 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 espermatozoos de salmón (100 µg mL⁻¹)

previamente desnaturalizado por calor (95 °C durante 10 minutos y 5 minutos en hielo). El filtro se prehibridó con esta solución incubándolo de 2 a 6 horas a 42 °C (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 °C durante 10 minutos y 5 minutos en hielo) y diluida en 2,5 mL de solución de prehibridación. El filtro se incubó con esta nueva solución durante toda la noche a 42 °C. 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 °C.

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% (m/v), 100 mL agua Milli-Q, 20 g de reactivo de bloqueo (Roche), 0,4 g N-laurilsarcosina

^aCalentar 800 ml de agua destilada, añadir el SDS, ajustar el pH a 7,2 y enrasar a 1 L con agua destilada.

^bDisolver el reactivo de bloqueo con agitación magnética y calor y añadir el mismo volumen de formamida desionizada. Se almacena a -20 °C.

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, el filtro se introdujo en bolsas de hibridación junto con 10 mL de tampón 2 y se incubó 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 anti-digoxigenina 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 el filtro 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 el filtro se lavó con agua destilada y se secó al aire.

Soluciones empleadas

Tampón 1	Tris-HCl 100 mM pH 8 y NaCl 150 mM
Tampón 2	Reactivo de bloqueo al 2% (m/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 °C.

1. 4. 13. Secuenciación del ADN.

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

1. 4. 14. Análisis informático de secuencias de ADN.

Para el análisis informático básico de las secuencias de ADN se empleó el programa de comparación de secuencias BLASTn disponible en la página web del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi). Para otro tipo de análisis de las secuencias de nucleótidos se utilizaron las aplicaciones informáticas disponibles en la página web deambulum (<http://bioinfo.hku.hk/services/deambulum/english/prog2.html#TRAD>).

1. 4. 15. Cuantificación de la expresión de genes bacterianos mediante qPCR.

Se incubaron los cultivos de las estirpes de *S. fredii* a estudiar en medio YM (suplementado con flavonoides cuando fue necesario) a 28 °C a 180 r.p.m. hasta que alcanzaron una densidad óptica a 600 nm de 0,5-0,8. La extracción del ARN bacteriano se realizó utilizando los kits RNAeasy kit (Qiagen, Suiza) y High pure RNA isolation kit (Roche, Suiza), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Posteriormente, el ARN obtenido se cuantificó en el nanodrop Thermo Scientific NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, EEUU) y se retrotranscribió utilizando el kit Quantitect (Qiagen, Suiza), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc obtenido se utilizó como

molde para llevar a cabo reacciones de PCR utilizando los cebadores específicos adecuados (**Tabla 7**). Los cebadores utilizados para ensayos de *q*PCR se diseñaron teniendo en cuenta que la longitud del amplicón estuviera comprendida entre 140 y 180 pb y con las características descritas en el apartado **1. 4. 10. de Material y Métodos**.

Tabla 7. Cebadores utilizados en esta Tesis para ensayos de *q*PCR de genes de *S. fredii* HH103.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	pb	Tm (°C)
nopCq_F	CAAAGGGGGGCATGGA	16	55,1
nopCq_R	CAACCGATCGAAGAGCTA	18	51,4
nopLq_F	GAGCTGGATCATGGCAA	17	52,3
nopLq_R	ATGCTGCCAATCAAGCA	17	52,5
nopIq_F	ACGTGGGTGGAAACGA	16	53,9
nopIq_R	GACGAATCTGTCTCGACA	18	51,3
nopAq_F	TGTCACGAGTGCAGTTGGA	19	56
nopAq_R	TGTCTGGAGCTCGGTCGTAA	20	57,8
nodA_F	CGTCATGTATCCGGTGCTGCA	21	60
nodA_R	CGTTGGCGGCAGGTTGAGA	19	61
16S_F	TAAACCACATGCTCCACC	18	52
16S_R	GATACCCTGGTAGTCCAC	18	51

1. 5. Técnicas relacionadas con las proteínas.

1. 5. 1. Extracción de las proteínas extracelulares de *S. fredii* HH103.

Se siguió el método descrito por **Krishnan y Pueppke (1993)** con ciertas modificaciones. Se inocularon matraces de 250 mL que contenían 50 mL de medio YM líquido (suplementado con 3,7 μ M de genisteína cuando fue necesario) con 500 μ L de cultivo de las estirpes a ensayar y se incubaron en agitación a 28 °C durante 40 horas. Transcurrido este tiempo, los cultivos se centrifugaron a 10000 g durante 20 minutos a 4 °C y se retiraron las células. Al sobrenadante obtenido se le añadieron 3 volúmenes de acetona fría y con la ayuda de una varilla se retiró el polisacárido precipitado. La mezcla se incubó a -20 °C durante al menos 24 horas para que las proteínas precipitaran. Posteriormente, se centrifugó a 17000 g durante 45 minutos a 4 °C y el pellet se lavó

con 100 mL de acetona al 70% volviendo a centrifugar a 17000 g durante 45 minutos a 4 °C. El sedimento obtenido se dejó secar completamente y se resuspendió en 300 µL de tampón de muestra 1X.

Solución empleada

Tampón de muestra 1X	Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2% (m/v), glicerol 20% (v/v), β-mercaptoetanol 5% (v/v), azul de bromofenol 0,05% (m/v)
----------------------	--

1. 5. 2. Cuantificación de proteínas

Se utilizó el método descrito por **Bradford (1976)**. Para determinar la concentración de proteínas de una muestra se mezclaron 500 µL de agua destilada con 500 µL de la solución de Bradford (Sigma, EEUU) y 5 µL de la muestra. La densidad óptica se midió a 595 nm empleando el espectrofotómetro modelo Helios Alpha Thermo Spectronic (Willem Scientific, EEUU). El valor de la concentración de las proteínas de la muestra se obtuvo a partir de una recta patrón.

1. 5. 3. Electroforesis unidireccional de las proteínas

La electroforesis unidireccional se realizó en condiciones desnaturalizantes, que separa las proteínas según su masa molecular, siguiendo el método descrito por **Laemmli (1970)**. Las proteínas se resuspendieron en tampón de muestra 1X, se calentaron a 100 °C durante 5 minutos y se mantuvieron en hielo. Posteriormente, las muestras se centrifugaron y el sobrenadante obtenido se cargó en el gel junto con el marcador de masa molecular de amplio rango suministrado por Bio-Rad (EEUU) o Fermentas (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Se prepararon geles de separación de distinta concentración de acrilamida dependiendo del tamaño de las proteínas que se querían separar. Así, se utilizaron geles del 12% de acrilamida para separar proteínas de mayor tamaño y geles del 15% para separar proteínas más pequeñas. Posteriormente, los geles inmersos en tampón de electroforesis 1X se corrieron a 150 V en cubetas Mini Protean II y Protean II (Bio-Rad, EEUU), hasta que el colorante alcanzó el borde inferior del gel. Se utilizaron geles de empaquetamiento al 4% de acrilamida.

Gel de separación	Gel de empaquetamiento			
	12%	15%	4%	
Acrilamida/bisacrilamida 40% 29:1	9 mL	11,25 mL	Acrilamida / bisacrilamida 40% 29:1	750 µL
H ₂ O destilada	13,05 mL	10,8 mL	H ₂ O destilada	4,7 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	7,5 mL	7,5 mL	Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,89 mL
SDS 10% (m/v)	300 µL	300 µL	SDS 10% (m/v)	75 µL
APS 10% (m/v)	125 µL	125 µL	APS 10% (m/v)	37,5 µL
TEMED	15 µL	15 µL	TEMED	7,5 µL

NOTA: los volúmenes indicados son los adecuados para geles de 17 x 17 cm.

Solución empleada

Tampón de electroforesis	Tris 25 mM	glicina 192 M,	SDS 0,1% (m/v) pH 8,3
--------------------------	------------	----------------	-----------------------

1. 5. 4. Tinción de las proteínas con azul de Coomassie.

En primer lugar, las proteínas del gel se fijaron con una solución compuesta por isopropanol al 25% y ácido acético glacial al 10%. Posteriormente, se lavó el gel en abundante agua Milli-Q durante 5 minutos en agitación suave. Este paso se repitió dos veces más. A continuación, el gel se sumergió en la solución Page Blue Protein Staining Solution [Fermentas (Thermo Fisher Scientific, EEUU)] durante al menos una hora en agitación. Por último, se lavó el gel con agua Milli-Q.

1. 5. 5. Tinción de las proteínas con plata.

La tinción de proteínas con plata es un método más sensible que la tinción con azul de Coomassie. Una vez terminada la electroforesis, el gel se sumergió en fijador durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadió el oxidante y se mantuvo otros 30 minutos en agitación. Posteriormente, se lavó tres veces durante 5 minutos con agua destilada, se añadió el reactivo de plata y se mantuvo durante 20 minutos en total oscuridad para evitar la tinción de fondo. Una vez teñido, el gel se lavó brevemente dos veces con agua destilada y se añadió el revelador. La reacción se detuvo lavando brevemente con agua destilada y añadiendo finalmente una solución de EDTA-Na₂ 2 H₂O (3,65 g en 250 mL de agua Milli-Q).

Soluciones empleadas

Fijador	Etanol 40% (v/v), ácido acético glacial 10% (v/v)
Oxidante	Etanol 30% (v/v), acetato de sodio 0,8 M, tiosulfato de sodio (5% [m/v]) 0,04% (v/v)
Reactivo de plata	Nitrato de plata 2,5% (m/v) en agua Milli-Q
Revelador	Na ₂ CO ₃ 0,22 M, formaldehído 0,0002% (v/v)

1. 5. 6. Inmunodetección de las proteínas.

Una vez realizada la electroforesis en un gel de poliacrilamida, las proteínas se transfirieron a filtros de nitrocelulosa o a membranas de polivinilo de difluoruro (PVDF). Para ello se utilizó el aparato de transferencia húmeda Mini Trans-Blot electrophoretic transfer cell (Bio-Rad, EEUU). Antes de la transferencia, el gel junto con la membrana se sumergió en el tampón de transferencia durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizó la transferencia de los péptidos desde el gel a la membrana utilizando un voltaje de 100 V durante 60 minutos. En el caso de las membranas de PVDF, éstas se deben activar previamente mediante inmersión durante unos segundos en metanol. Para comprobar que la transferencia se había realizado correctamente, la membrana se tiñó con rojo Ponceau durante 3 minutos. Posteriormente, se lavó con agua destilada hasta que las bandas correspondientes a proteínas se observaron nítidamente y se dejó secar. La membrana así seca se puede almacenar hasta su uso o bien continuar con la inmunodetección. En el caso de que se almacenasen, las membranas de PVDF se deben volver a activarse con metanol.

La membrana se sumergió en tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Transcurrido este tiempo, se añadió el anticuerpo primario en una dilución 1:2500 y se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Después se lavó vigorosamente la membrana con TBST durante unos segundos y posteriormente se lavó con abundante TBST cuatro veces en agitación durante 15 minutos. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario 1:7500, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave y se volvió a lavar como en el paso anterior. La membrana se sumergió en tampón 3 durante 5 minutos y se reveló usando NBT-BCIP (nitroazul de tetrazolio-fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indoil).

Soluciones empleadas

Tampón de transferencia húmeda	Tris 25 mM pH 8,3*, glicina 192 mM, etanol absoluto 20% (v/v)
Rojo Ponceau	Rojo Ponceau 0,1% (m/v) en ácido acético glacial 5% (v/v)
TBS 10X	Tris 0,2 M, NaCl 1,3 M. Ajustar el pH a 7,6
Tampón de bloqueo	TBS 1X, BSA 2% (m/v)
TBST	TBS 1X, Tween-20 0,1% (v/v)
Tampón 3	Tris-HCl 80 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl ₂ 50 mM
Solución de color	45 µL de solución NBT (75 mg mL ⁻¹ de nitroazul de tetrazolio en dimetilformamida al 70%), 35 µL de solución de BCIP (50 mg mL ⁻¹ de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato endimetilformamida al 100%) en 10 mL de tampón 3

* no ajustar el pH.

1.5. 7. Expresión y purificación de proteínas de fusión a la Glutación S-Transferasa (GST).

Expresión de proteínas de fusión unidas a GST.

La expresión de proteínas unidas a la GST se realizó mediante el método descrito por **Sambrook y Russell (2001)**. Una colonia de *E. coli* BL21, con el plásmido de expresión que porta los genes que codifican para la proteína de fusión, se preinoculó en 5 mL del medio LB suplementado con los antibióticos adecuados y se incubó a 37 °C en agitación durante toda la noche. Una vez crecido, se inocularon los 5 mL en 100 mL del mismo medio y se incubó a 37 °C en agitación hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó un valor aproximado de 0,8. Posteriormente, se le añadió isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 100 mM para inducir la expresión de los genes que codifican para la proteína de fusión. El cultivo se incubó a 28 °C en agitación durante al menos cuatro horas. Transcurrido este tiempo, se dividió el volumen en dos tubos Falcon de 50 mL y se centrifugó a 2500 g a 4 °C durante 20 minutos. A continuación, se descartó el sobrenadante, el pellet se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Purificación de proteínas de fusión unidas a GST.

Se siguió el método descrito por **Smith y Johnson (1988)** con ciertas modificaciones. El pellet congelado en el tubo Falcon de 50 mL se resuspendió en 3 mL

de tampón de extracción con 5 mM de ditioneitol (DTT). Además, se añadieron una serie de inhibidores de proteasas de *E. coli* [quimiostatina, leupeptina y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), a las concentraciones de 0,01 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, 2 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ y 1mM, respectivamente]. El pellet se incubó en hielo durante 10 minutos y se sonicó durante 6 minutos mediante ciclos de 20 segundos de sonicación y 10 segundos de pausa. El tubo Falcon se mantuvo en todo momento en hielo para evitar la degradación de las proteínas de la muestra. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 10000 g durante 15 minutos a 4 °C. Tras la centrifugación, se obtuvieron dos fases: la fase soluble, que contiene la proteína de estudio, y la insoluble, que corresponde a las membranas de la bacteria y las proteínas ancladas a ésta. A continuación, se añadió 1 mL del sobrenadante obtenido anteriormente a una columna con la resina Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare, Reino Unido), previamente preparada y equilibrada.

Para el equilibrado de las columnas, se añadieron en un tubo eppendorf 133 μL de la resina Glutathione Sepharose 4B y 1,4 mL de tampón fosfato (PBS) 1X frío. La columna se centrifugó a 500 g durante 5 minutos a 4 °C descartando el sobrenadante y teniendo especial cuidado de no dejar seca la resina. Posteriormente, se añadió a la resina 100 μL de tampón de extracción frío con los inhibidores de proteasas a las concentraciones previamente descritas. La columna, ya equilibrada, se incubó durante al menos una hora en agitación a 4 °C. Tras la incubación, se centrifugó a 500 g durante 5 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se lavó la columna para retirar las proteínas que no estuvieran unidas a la resina, es decir, las que no son proteínas de fusión a GST. Para ello, se añadieron 500 μL del tampón de lavado con 5 mM DTT, se centrifugó a 500 g durante 5 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Este paso se repitió al menos dos veces más. Por último, se eluyó la proteína de estudio añadiendo 50 μL de tampón de elución. Este tampón contiene glutatión, molécula que tiene más afinidad por la resina que la propia GST.

La columna se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, agitando suavemente el tubo eppendorf cada cierto tiempo para que la proteína de fusión a GST se desprendiera de la resina con mayor facilidad. Transcurrido este tiempo, la columna se centrifugó a 500 g durante 5 minutos a 4 °C y el eluyente se conservó a -20 °C hasta su uso. Este paso se repitió dos veces más obteniéndose tres volúmenes de elución.

Soluciones empleadas

Tampón de extracción	Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, Tritón X-100 0,02%, Tween20 0,05%, EDTA 5 mM, EGTA 1 mM
Tampón de lavado	Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, EGTA 1 mM
Tampón de elución	Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, glutatión reducido 10 mM (Sigma Aldrich, EEUU).
Tampón PBS	K ₂ HPO ₄ 100 mM, KH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 7,2

1. 5. 8. Análisis informático relacionado con proteínas.

La comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas estudiadas en esta Tesis con las secuencias disponibles en las bases de datos se realizó utilizando el programa BLASTp, disponible en la página web del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi). Para la predicción de aminoácidos fosforilables se utilizó el programa NetPhos 2.0 Server.

2. Material y métodos utilizados para los estudios con plantas.

2. 1. Plantas.

Las plantas empleadas en esta Tesis están recogidas en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Plantas utilizadas en esta Tesis.

Espece	Variedad
<i>Glycine max</i> (L.) Merrill	Williams 82
<i>Sophora tomentosa</i> (L.) Isely	
<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	
<i>Lotus japonicus</i> (Regel) Larsen	
<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin	

2. 2. Soluciones nutritivas para las plantas.

Para el crecimiento de las plantas leguminosas se utilizó la solución de Fåhraeus carente de nitrógeno combinado.

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

El pH del medio se ajustó a 6,5 -7,0 y posteriormente se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 °C). *Es importante añadir primero la solución de Gibson y el citrato férrico. El citrato férrico se preparó disolviendo con calor 5 g L⁻¹ de citrato férrico en H₂O destilada.

Solución de micronutrientes de Gibson	
H ₃ BO ₃	2,86 g
MnSO ₄ H ₂ O	2,08 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,22 g
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0,08 g
Na ₂ MoO ₄	0,13 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

2. 3. Desinfección y germinación de semillas.

Las semillas de *G. max*, *V. unguiculata*, *S. tomentosa* y *L. japonicus* se desinfectaron mediante un tratamiento con etanol de 96° durante 30 segundos, seguido de otro con hipoclorito sódico al 6% (m/v) durante 6 minutos. Tras ello, las semillas se lavaron seis veces con abundante agua destilada estéril. En el caso de las semillas de *L. japonicus*, éstas se escarificaron suavemente con una lija antes de su desinfección. Las semillas desinfectadas se colocaron en placas de Petri que contenían agar-agua al 1% (m/v) y se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente o a 28 °C hasta su germinación. Las semillas de *N. benthamiana* se sembraron directamente sobre macetas que contenían sustrato orgánico.

2. 4. Inoculación y cultivo de plantas.

Las semillas germinadas se transfirieron a diferentes sistemas según el experimento realizado:

♣ **Jarro de Leonard (Vincent, 1970):** El sistema consiste en un depósito de ~1,5 L que contiene solución de Fåhraeus. Sobre este depósito se colocó una maceta que contenía 800 cm³ de vermiculita mezclada con perlita [vermiculita:perlita (4:1)] y humedecidas con 250 mL de la misma solución nutritiva. La maceta y el depósito se conectaron mediante una mecha de algodón de aproximadamente 20 cm de longitud. El jarro completo se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 °C). En cada jarro se colocaron dos semillas. En el caso de *L. japonicum* los ensayos de nodulación se realizaron en minijarros de Leonard [aproximadamente 200 cm³ de vermiculita en la parte superior y un depósito de ~200 mL que contenía la solución nutritiva]. Cada semilla se inoculó con 1 mL de cultivo bacteriano crecido en medio YM que presentaban una densidad óptica a 600 nm de alrededor de 0,8.

♣ **Sistema de hidroponía en vaso de precipitado:** Se colocaron 10 semillas de soja Williams sobre una rejilla que descansaba sobre un depósito que contenía 150 mL de solución Fåhraeus 1X y 15 mL de un cultivo bacteriano crecido en medio



Figura 9. Sistema de hidroponía en vaso de precipitado

YM a una densidad óptica a 600 nm de alrededor de 0,8. Este sistema se encontraba en el interior de un vaso de precipitado de cristal de 2 L con tapa de cristal que contenía 100 mL de agua destilada estéril, para favorecer condiciones de alta humedad (**Figura 9**). Todos los componentes del sistema fueron esterilizados en el autoclave (20 minutos a 121 °C a una atmósfera de sobrepresión).

♣ **Cajón estéril:** Cajas de plástico estériles, de 30 cm de largo, 23 cm de ancho y 18 cm de ancho, se rellenaron a la mitad con vermiculita esterilizada en el autoclave (20 minutos a 121 °C a una atmósfera de sobrepresión) y 1 L de solución Fåhræus 1X. Se colocaron en cada caja 30 semillas de soja Williams, se inocularon con 1 mL de cultivo cada una y se tapó el sistema con papel de película transparente para evitar problemas de contaminación y para mantener la humedad.

♣ **Maceta:** Las semillas de *N. benthamiana* se colocaron en macetas de 10 cm de diámetro que contenían sustrato vegetal. A las dos semanas, cada plántula se sembró en macetas individuales que contenían el mismo soporte.

2. 5. Ensayos de nodulación.

Los ensayos de nodulación se realizaron para analizar las propiedades simbióticas de las distintas estirpes estudiadas en esta Tesis. Se llevaron a cabo en cámaras de plantas con un fotoperíodo de 16 horas de luz (con intensidad de $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 8 horas de oscuridad a 26 °C y 18 °C, respectivamente. El periodo de cultivo de las plantas varió dependiendo de la especie vegetal. Así, las plantas de soja y de *V. unguiculata* se cultivaron durante 7 semanas, mientras que el período de cultivo aproximado para las plantas de *L. japonicus* y *S. tomentosa* fue de dos meses. Los análisis estadísticos de los resultados fueron realizados con el programa Statistix for Windows Analytical software, usando el test adecuado.

Secado de la parte aérea de la planta.

La parte aérea de las plantas se secó en una estufa para desecación (J.P. Selecta, España) a 65-70 °C durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo se dejó otras 24 horas con el horno apagado y se pesó.

Aislamientos de las bacterias de los nódulos.

Los nódulos se separaron de las raíces y se desinfectaron mediante un tratamiento con hipoclorito al 12% durante 2 ó 3 minutos. A continuación, se enjuagaron abundantemente con agua destilada y se rodaron en cajas de medio TY 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 TY para obtener colonias aisladas. Una vez crecidas, distintas colonias se picaron placas de TY suplementadas con los antibióticos apropiados para identificar las bacterias aisladas del nódulo.

2. 6. Extracción y cuantificación de los pigmentos fotosintéticos.

Se siguió el método descrito por **Buschmann *et al.* (1984)** con ciertas modificaciones. Se seleccionaron dos hojas de cada planta que se encontraban a una altura determinada del tallo para minimizar el error. Las hojas se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Se trituraron 0,5 g de hojas en 10 mL de una solución de acetona al 80%. Esta mezcla se centrifugó durante dos minutos a 12000 g y se descartó el pellet. La absorbancia se midió a 663,2 nm, 646,8 nm y 470 nm, y se calculó la concentración de los distintos pigmentos mediante las siguientes fórmulas:

Concentración de los pigmentos (ng/L)	Fórmula para hallar la concentración
Concentración de clorofila a (Ca)	$C_a = 12,25 \times \text{Abs}_{663,2} - 2,79 \times \text{Abs}_{646,8}$
Concentración de clorofila b (Cb)	$C_b = 21,50 \times \text{Abs}_{646,8} - 5,10 \times \text{Abs}_{663,2}$
Concentración total de clorofilas (Ca+b)	$C_{a+b} = 7,15 \times \text{Abs}_{663,2} + 18,71 \times \text{Abs}_{646,8}$
Concentración total de carotenoides (Cc+d)	$C_{c+d} = (1000 \times \text{Abs}_{470} - 1,82 \times C_a - 85,02 \times C_b) / 198$

2. 7. Utilización de bioluminiscencia para el estudio de la expresión de promotores de *S. fredii* HH103 *in vivo* en simbiosis con soja Williams.

Cuatro semillas de soja Williams, germinadas durante 48 horas en placas de agar-agua al 1%, se colocaron en una placa de Petri de 16 x 16 cm estéril y se añadió una mezcla compuesta por 40 mL de un cultivo de *S. fredii* HH103 (pMUS1207) en fase

estacionaria (crecido en medio YM con tetraciclina a $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$) y 80 mL de una mezcla al 50% (v/v) de medio YM 2X y Fåhraeus 2X, con agar al 2% (m/v). El plásmido pMUS1207 porta la caja *tts* del operón que contiene los genes *nopC* y *nopA* de *S. fredii* HH103 seguido de los genes *luxCDABE* de *Vibrio fischeri* y permite estudiar la expresión del promotor *tts* mediante luminiscencia.

Una vez que se solidificó la mezcla anterior, se cortó y retiró con la ayuda de un bisturí estéril el medio que cubría el hipocótilo de las plántulas. De este modo, la raíz de la plántula se encontraba totalmente sumergida en el medio y la parte aérea no tenía ningún impedimento para desarrollarse de forma natural. Las placas se sellaron con parafina para que no perdieran humedad y se cultivaron durante 6 días en una cámara de plantas, bajo las condiciones descritas en el apartado **2. 5. de Material y Métodos**. La monitorización de la bioluminiscencia se realizó usando el equipo IVIS Lumina II (Japón) y el programa Living Image 4.0. Las placas se sometieron al recuento de fotones cada día, una hora antes de que terminase el periodo de luz y una hora antes de que terminase el periodo de oscuridad. El tiempo de exposición de cada captura fue de 10 segundos.

2. 8. Cuantificación de hormonas.

2. 8. 1. Extracción y cuantificación de ácido salicílico usando el biosensor *Acinetobacter* sp. ADP1.

Extracción del ácido salicílico.

El método que se siguió para la extracción del ácido salicílico se elaboró a partir de una serie de adaptaciones de los trabajos de **Bowling *et al.* (1994)** y **Enyedi *et al.* (1992)**. Las raíces de soja Williams se pulverizaron en un mortero con nitrógeno líquido. 0,2 g de extracto de raíces de soja se pesaron y se realizó una extracción triturando el extracto en un mortero con 2 mL de una solución de 90:10 de metanol:agua. Seguidamente, el extracto se pasó a un tubo eppendorf de 2 mL y se sonicó en un baño (J. P. Selecta, España) durante 30 minutos a temperatura ambiente y la muestras se incubaron toda la noche a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Transcurrido este tiempo, se volvió a sonicar la muestra durante 30 minutos y se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos. El sobrenadante se pasó a otro tubo eppendorf y se evaporó en un rotavapor (Heto Holten

Ltd., Reino Unido) a 40 °C. El residuo seco se resuspendió en una solución de acetato sódico 0,1 M a pH 4,5 y se incubó durante toda la noche a 37 °C. Posteriormente, se añadió un volumen de acetato de etilo acidificado, se agitó la mezcla y se centrifugó a 12000 g durante tres minutos. La capa superior se recuperó en otro eppendorf y se evaporó en el rotavapor a temperatura ambiente. Finalmente, el pellet se resuspendió en 300 µL de una solución de metanol:agua (50:50 v/v) y el tubo eppendorf que contenía la muestra se dejó abierto hasta que se evaporó el metanol por completo, quedando el ácido salicílico disuelto en 150 µL de agua.

Cuantificación del ácido salicílico.

Se siguió el protocolo descrito por **DeFraia et al. (2008)** con algunas modificaciones. Se inoculó una colonia de *Acinetobacter* sp. ADP1 en 5 mL de LB sin antibióticos y se incubó durante toda la noche a 28 °C en agitación. Al día siguiente, se inocularon los 5 mL del cultivo crecido en un volumen final de 100 mL de medio LB y se incubó a 37 °C en agitación hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó exactamente 0,3. En cada pocillo de una placa de microtítulo de 96 pocillos (Vision Plate 96, Reino Unido) se mezclaron 100 µL del cultivo, 50 µL de la muestra de extracción de ácido salicílico y 50 µL de una solución de MgCl₂ a una concentración de 10 mM. La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y se midió la luminiscencia en un lector de placas Synergy HT (BioTek, EEUU) (**Figura 10**). A partir de los datos obtenidos se calculó la media (± la desviación típica de la media) de tres réplicas de dos muestras biológicas independientes. La curva de calibración se obtuvo a partir de concentraciones crecientes y conocidas de una solución que contenía ácido salicílico comercial. Para cada experimento se realizó una curva de calibrado. El valor del patrón sin ácido salicílico se le restó a los valores de las diferentes muestras ensayadas. La conversión de los valores de luminiscencia a concentración de ácido salicílico se obtuvo a partir de la pendiente de la recta patrón. La concentración final de ácido salicílico, o SA, se halló mediante la siguiente ecuación:

$$\text{ng SA / g masa fresca} = A \times B \times C \times DF$$

A: Valor obtenido bajo las condiciones experimentales. Se expresó en µM SA/10⁶ para la conversión de µM de SA a M de SA.

B: Volumen de la muestra expresado en $L = 50/10^6$

C: Peso molecular del SA expresado en $ng = 138,12 \text{ g/mol} \times 10^9$

DF: Factor de dilución = [volumen del pocillo (200 μL) / volumen de la muestra (50 μL)] x [volumen total de la extracción de SA en el tubo eppendorf (150 μL) / volumen de la muestra (50 μL)] x (1 g de masa fresca de raíz de soja / 0,2 g usado para la extracción de SA).

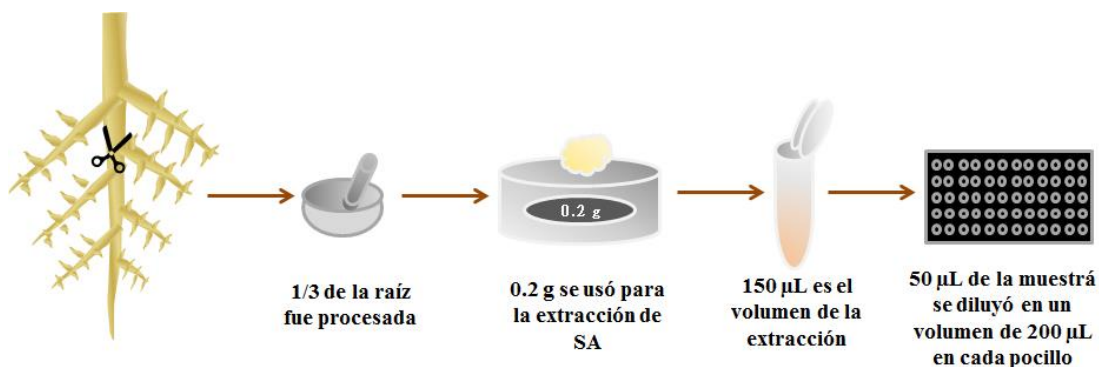


Figura 10. Esquema del procesamiento de las muestras para la cuantificación de ácido salicílico.

2.8. 2. Cuantificación de ácido salicílico, ácido abscísico y ácido jasmónico-isoleucina mediante HPLC.

Extracción de las hormonas.

Las raíces de plantas de soja Williams, no inoculadas o inoculadas con las estirpes adecuadas y cultivadas en cajones estériles, se congelaron en nitrógeno líquido, se pulverizaron en un mortero y se liofilizaron. Posteriormente, las muestras se procesaron y analizaron en el Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural de la Universitat Jaume I (Castellón, Valencia). Una alícuota de 0,5 g de tejido liofilizado se extrajo en 5 mL de agua destilada y se enriqueció la muestra con 50 μL de una mezcla de estándares: 5 ng de [$^2\text{H}_2$] IAA y 100 ng de [$^2\text{H}_6$] ABA, [$^2\text{H}_4$] SA, y [$^2\text{H}_2$] JA-Ile. La mezcla se centrifugó a 4000 g a 4 $^\circ\text{C}$, se recuperó el sobrenadante y se le ajustó el pH a 3 con ácido acético al 30%. Posteriormente, se trató la muestra dos veces con 3 mL de dietil éter. En cada paso la capa superior se recuperó y evaporó en una centrífuga de vacío (Speed vac, Jouan, Saint Herblain Cedex, Francia). El residuo seco se resuspendió en MeOH al 10% (v/v) mediante sonicación. Por último, se filtró la muestra usando una jeringuilla con filtro de celulosa de 0,22 μm (Albert S. A., España) e inyectando directamente en el sistema HPLC.

Cromatografía y espectrometría de masas

La cromatografía líquida de alta resolución se realizó con el sistema Waters Alliance 2690, que consiste en una bomba cuaternaria y un autosampler. Alícuotas de 20 μL se inyectaron en una columna de fase reversa Nucleosil ODS (50 x 2 mm diámetro interno, 1,8 μm , España). Las hormonas se eluyeron con un gradiente de metanol y ácido acético al 0,01% en agua, empezando desde la fracción 10:90 (v/v). Las condiciones isocráticas del 10:90 se conservaron durante los últimos dos minutos de la carrera. Las condiciones iniciales se restauraron permitiendo el equilibrado del sistema durante 3 minutos, de modo que el proceso duró 10 minutos para cada muestra. El ratio del flujo fue de 0,3 mL min^{-1} y la presión alrededor de 211-220 bares. Usando una interfaz de electrospray Z-spray ortogonal (Micromass, Reino Unido), los eluyentes que se obtuvieron por HPLC se introdujeron en un espectrómetro de masas triple-cuadrupolo (TQD, Micromass). Como gas seco se usó el nitrógeno. Para operar en el modo tándem MS (MS/MS), el gas de colisión fue argón puro al 99,995% (Carbueros metálicos, España) y una presión de 2×10^{-3} mbar en la célula de colisión. La temperatura del gas de desolvación fue de 350 $^{\circ}\text{C}$, la temperatura de la fuente de 120 $^{\circ}\text{C}$ y el voltaje capilar de -3 kV. El espectrómetro de masas se operó mediante el modo de monitorización múltiple (MRM). El voltaje de cono y las energías de colisión se resumen en la **Tabla 9**. Los cromatogramas se procesaron con el programa Masslynx NT 4.0 (Micromass).

Tabla 9. Voltaje de cono y energías de colisión usados en el sistema HPLC para cuantificar las fitohormonas.

Compuesto	Voltaje de cono (V)	Energía de colisión (eV)	Ión precursor (m/z)	Transición de diagnóstico (m/z)
ABA	25	12	263	263 > 253
[$^2\text{H}_6$] ABA	25	12	269	269 > 159
IAA	20	10	174	174 > 130
[$^2\text{H}_2$] IAA	20	10	176	176 > 132
JA	40	15	209	209 > 59
DHJA	25	15	211	211 > 59
SA	20	20	137	137 > 93
[$^2\text{H}_4$] SA	20	20	141	137 > 97
JA-Ile	25	12	322	322 > 130
[$^2\text{H}_2$] JA-Ile	25	12	324	322 > 131

2.8. 3. Cuantificación de etileno por cromatografía de gases.

Preparación de las muestras.

Las semillas de soja Williams, germinadas en agar agua al 1% durante 48 horas, se sumergieron durante 10 minutos en 20 mL de un cultivo crecido de la estirpe *S. fredii* HH103 y sus derivados a una densidad óptica a 600 nm de 0,9, o en 20 mL de medio YM en el caso del control sin inocular. Transcurrido este tiempo, dos semillas germinadas del mismo tamaño se introdujeron en botes pequeños de cromatografía de 9 mL de volumen, que se taparon con un tapón de goma, se sellaron y se incubaron durante 24 horas en la cámara de cultivo.

Cromatografía.

Se realizó en colaboración con la Dra. Blanca Vioque Cubero (Instituto de la Grasa, CSIC, Sevilla). La determinación de la concentración de etileno se llevó a cabo por cromatografía de gases. Para ello, se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard modelo 5890, dotado de un detector de ionización de llama (FID) y una columna de alúmina activada F1 80-100 mallas (Supelco, Inc. Bellefonte, EEUU) de 2 m x 3 mm de diámetro interno. Como gas portador se utilizó nitrógeno, con un flujo de 30 mL min⁻¹, manteniéndose el horno a 100°C y el inyector y el detector a 150 °C. En estas condiciones el etileno presenta un tiempo de retención de aproximadamente un minuto. La cuantificación del etileno se realizó mediante una recta de calibrado, obtenida con un patrón de concentración adecuada (87,4 pmoles mL⁻¹), preparado a partir de una mezcla gaseosa comercial denominado Azethyl (5,04% de etileno en N₂) de la Sociedad Española del Oxígeno (S.E.O.). La introducción del factor 2.8068 e⁻⁴ en un integrador Hewlett Packard modelo 3392A permite convertir el área del pico de etileno en picomoles.

2.9. Medida de la producción de ácido malondialdehído (MDA).

La cuantificación de MDA se usó para determinar el grado de peroxidación de los lípidos del tejido radical de las plantas de soja Williams causado por los altos niveles de producción de ROS. Las raíces de soja Williams, no inoculadas o inoculadas con las estirpes adecuadas, se cultivaron en el sistema de cajones estériles. Las raíces de las

plantas se pulverizaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Posteriormente, se trituraron 0,2 g del material en un mortero frío con 2 mL de una solución de ácido tricloroacético al 20% (m/v) y ácido tiobarbitúrico al 0,05% (m/v). La muestra se centrifugó a 12000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se incubó a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Finalmente, la muestra se incubó en durante 10 minutos hielo para detener la reacción, se centrifugó a 12000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 532 nm. La concentración de MDA se calculó usando la siguiente ecuación:

$$64,52 \times \text{Abs}_{532\text{nm}} = \text{nmol MDA g}^{-1} \text{ masa fresca}$$

2.10. Detección de depósitos de calosa.

Las semillas germinadas de soja Williams, no inoculadas o inoculadas con las estirpes adecuadas, se colocaron en cajas de Petri de 10 x 10 cm que contenían 100 mL de solución Fåhraeus 1X. Las raíces se mantuvieron en oscuridad para evitar la excesiva exposición a la luz y las plántulas se cultivaron durante 48 horas en una cámara de cultivo, bajo las condiciones descritas en el apartado **2. 5. de Material y Métodos**. Tras este tiempo, las raíces de las plántulas se fijaron durante toda la noche en la solución I. Seguidamente, las raíces se rehidrataron en concentraciones crecientes de etanol y se incubaron durante 3 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la solución II. Por último, las raíces se tiñeron en la solución III. Las muestras se analizaron usando un microscopio confocal invertido LSM510 (Zeiss, Alemania) con un objetivo plano apocromático 10X. Se tomaron 10 imágenes para cada tratamiento de aquellas áreas de la raíz enriquecidas en pelos radicales jóvenes.

Soluciones empleadas

Solución I	Etanol:ácido acético, en una proporción de 3:1
Solución II	Hidróxido de potasio al 10% (m/v)
Solución III	150 mM K_2HPO_4 , pH 9.5 y 0.01% (m/v) de azul de anilina

2.11. Detección de tejidos necróticos en hojas de soja.

Las plantas de soja Williams, no inoculadas o inoculadas con las estirpes de rizobios adecuadas, se cultivaron en el sistema de hidroponía en vasos de precipitado. 10 días

después de la inoculación, a las hojas más verdes y tiernas se les realizó una pequeña herida con una aguja en el envés. Con una jeringuilla de 2 mL, sin aguja, se inoculó un volumen determinado de un cultivo de *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* en una solución de MgCl₂ 10 mM cuya densidad óptica a 600 nm fue de 1. Al mismo tiempo, se presionó el haz de la hoja para que el cultivo penetrara en las capas del tejido epidérmico. A las 24 y 48 horas se observó si existían zonas necróticas y se fotografiaron los resultados.

2. 12. Cuantificación de la expresión de genes de soja mediante qPCR.

Alrededor de 10 semillas de soja Williams, germinadas en placas de agar-agua al 1% a 28 °C y en oscuridad, se sembraron en un sistema de hidroponía en vaso de precipitado. Tras el cultivo de las plantas, se cortó el primer tercio de la raíces de las plantas, se envolvieron en papel de aluminio, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. El ARN se extrajo utilizando el kit RNAeasy plant mini kit (Qiagen, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez extraído el ARN, se calculó su concentración mediante la medida de la absorbancia de la muestra a 260 nm utilizando un nanodrop Thermo Scientific NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, EEUU) o mediante el uso del fluorómetro Qubit (Invitrogen, EEUU) y se retrotranscribió utilizando el kit Quantitect (Qiagen, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc obtenido se utilizó como molde para llevar a cabo reacciones de PCR utilizando los cebadores específicos adecuados (**Tabla 10**). Los cebadores se diseñaron a partir de la zona del ADN codificante y teniendo en cuenta las características descritas en los apartados **1. 4. 10.** y **1. 4. 15. de Material y Métodos.**

Tabla 10. Cebadores utilizados en esta Tesis para ensayos de qPCR de genes de soja Williams.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	pb	Tm (°C)
<i>UBI</i> qF	GTGTAATGTTGGATGTGTTCCC	22	54
<i>UBI</i> qR	ACACAATTGAGTTCAACACAAACCG	25	56,6
<i>ELF1B</i> _F	GTTGAAAAGCCAGGGGACA	19	55,5
<i>ELF1B</i> _R	TCTTACCCCTTGAGCGTGG	19	56,9
<i>WRKY33</i> qF2	CAAGAGAAGGAAATCTCGTGTG	22	53,4

Tabla 10. Cebadores utilizados en esta Tesis para ensayos de *qPCR* de genes de soja Williams.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	pb	Tm (°C)
<i>WRKY33qR2</i>	CTCTCACGCTACTGCACTTATA	22	53,9
<i>Glyma09g00800-F</i>	TTGGACACGGTTTTGTTAAGG	21	53,5
<i>Glyma09g00800-R</i>	AGTGAATCCCAAAAACCTCGT	21	54,5
<i>GmNINaF</i>	TAACATGCGATGCTGATCTTG	21	53,2
<i>GmNINaR</i>	TGATTTAGAGGGCGAAGCTTGA	21	54
<i>GmNINbF</i>	CACCAACATCTTGAGTCTCTACC	23	54,9
<i>GmNINbR</i>	TCTGCAAATCTCTGAATCCCCA	22	56,2
<i>ENOD40F</i>	GAAAGGGGTGTGAGAGGAGAG	21	56,8
<i>ENOD40R</i>	CGCCACTCAAGAAAGAATGTT	21	53,5
<i>Glyma14g05840-F</i> (Peroxidasa)	GAGTCAGTGGAACCACCATTG	21	55,8
<i>Glyma14g05840-R</i> (Peroxidasa)	CCACTCCCCTTTCTTTGACA	21	55
<i>Glyma02g42730-F</i> (Peroxidasa)	AGGGGACTAATGTCTCCCATC	21	55,7
<i>Glyma02g42730-R</i> (Peroxidasa)	GGTGGTTCCACTGACTCCATA	21	56,3
<i>GmMAPK4_F</i>	ATGTCTGCTGTTGAGTCAGCTG	22	57,3
<i>GmMAPK4_R</i>	TCAGTAGACTGGTGGAAACAGGATT	24	57,4

2. 13. Técnicas relacionadas con las proteínas.

2. 13. 1. Preparación de un extracto proteico para la inmunodetección.

Preparación de un extracto de proteínas de raíces de soja.

Las plantas de soja Williams se cultivaron en un sistema de hidroponía en vaso de precipitado. Las raíces de las plantas, no inoculadas o inoculadas con las estirpes adecuadas, se cortaron, se congelaron en nitrógeno líquido, se pulverizaron en un mortero y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Se homogeneizaron 0,2 g de tejido radical pulverizado en un mortero que contenía 2 mL de tampón de extracción y una punta de espátula de arena. La mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 12000 g a 4 °C. El sobrenadante se usó directamente para la inmunodetección si la concentración de la proteína vegetal era suficiente para ser detectada con el anticuerpo utilizado. En caso contrario, la muestra se concentró añadiendo al sobrenadante obtenido en el último paso 0,39 g/mL de (NH₄)₂SO₄ para precipitar y concentrar las proteínas del extracto. La

muestra se mezcló vigorosamente y se centrifugó durante 5 minutos a 10500 g a 4 °C. El pellet se secó usando una jeringuilla para retirar los restos de sobrenadante y se resuspendió en 200 µL de tampón de extracción con 2 µL de una mezcla de inhibidores de proteasas de plantas (Protease inhibitor cocktail for plant cell and tissue extract, Sigma Aldrich, EEUU). El extracto se purificó como se describe en el apartado **2. 13. 2. de Material y Métodos**. La inmunodetección se realizó como se describe en el apartado **1. 5. 6. de Material y Métodos**.

Solución empleada

Tampón de extracción	Tris HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, EGTA 1 mM
----------------------	--

*Preparación de un extracto de proteínas de hojas de *Nicotiana benthamiana*.*

Una hoja de *N. benthamiana* proveniente de una planta transformada con *Agrobacterium tumefaciens* CV3101, como se describe en el apartado **2. 13. 5. de Material y Métodos**, que contenían los plásmidos necesarios para la expresión de proteínas de fusión a YFP-HA, se trituró en un mortero con nitrógeno líquido hasta que quedó un extracto pulverizado. En un mortero se homogeneizaron 0,2 g del extracto pulverizado con 1 mL de tampón de extracción y una punta de espátula de arena. La mezcla se centrifugó en un eppendorf a 3000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se pasó a otro tubo eppendorf, se centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo eppendorf. La inmunodetección se realizó como se describe en el apartado en el apartado **1. 5. 6. de Material y Métodos**.

Solución empleada

Tampón de extracción	Tween 20 1%, Tris HCl pH 7,5 100 mM, NaCl 150 mM, Glicerol 10%
----------------------	--

2. 13. 2. Ensayo de fosforilación *in vitro*.

La preparación del extracto de proteínas de raíces de soja se llevó a cabo la metodología descrita en el apartado **2. 13. 1. de Material y Métodos**.

Equilibrado de la columna y purificación del extracto.

Se rellenaron columnas de cromatografía (BioRad, EEUU) de 2 mL de volumen con Sephadex G25 hidratado al 5% (v/v) (1 x 5 cm, Sigma Aldrich, EEUU) que se homogeneizó con una espátula. Posteriormente, se añadieron lentamente 20 mL de tampón de extracción a cada columna para no resuspender la matriz. Una vez que se eluyó casi todo el volumen, se cerró el tapón de la columna, se dejó un pequeño volumen de tampón y se tapó la columna por la parte superior para evitar que se secase la matriz. La columna, ya equilibrada, pudo almacenarse a 4 °C hasta su uso. La purificación del extracto crudo de raíz de soja se realizó añadiendo los 200 µL del extracto obtenido anteriormente a la columna (sin retirar el tapón inferior). Seguidamente, se liberó la columna del tapón inferior para favorecer la infiltración del extracto en la matriz. Tras esto, se colocó de nuevo el tapón y se añadieron lentamente 2 mL de tampón de extracción. El tapón inferior se volvió a retirar, descartando los primeros 500 µL de eluyente y se recogieron las siguientes 5 gotas. Éstas constituyeron el volumen de extracto de proteínas purificado.

Solución empleada

Tampón de extracción	Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, EGTA 1 mM
----------------------	--

Experimentos de fosforilación de proteínas.

Se mezcló en un tubo eppendorf una concentración determinada del extracto purificado de raíces de soja con 5-10 µg de la proteína recombinante unida a GST (apartado **1. 5. 7. de Material y Métodos**), 1 mM de MgCl₂, 1 mM de CaCl₂, un inhibidor de la adenilato ciclasa (AP₅A) y 1 µCi de ATP (γ-32P). La mezcla se incubó durante 90 minutos en un baño a 30 °C. A continuación, se le añadió tampón de disociación y se hirvió durante 5 minutos a 90 °C para detener la reacción de fosforilación. La muestra se cargó en un gel de poli(acrilamida) al 12 % de 0,75 mm de grosor. Una vez que la carrera finalizó, el gel se tiñó con azul de Coomassie durante toda la noche, se destiñó con agua Milli-Q, se incubó durante 30 minutos en tampón de secado, se colocó sobre papel Whatman y se secó durante dos horas. Transcurrido este

tiempo, el gel se colocó sobre una placa fotográfica que se almacenó en un casete de revelado durante al menos 24 horas. Finalmente, la placa se reveló mediante el sistema modular de análisis de imagen Fujifilm LAS-5100 (Fujifilm, Japón).

Soluciones empleadas

Tampón de disociación	Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2% (m/v), glicerol 20% (v/v), β -mercaptoetanol 5% (v/v), azul de bromofenol 0,05% (m/v)
Tampón de secado	Glicerol 3% (v/v), metanol 40% (v/v), ácido acético 10% (v/v)

Los inhibidores de quinasas usados en los experimentos de fosforilación *in vitro* se describen en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Inhibidores de quinasas usados en esta Tesis.

Compuesto	Concentración del stock (mM)	Concentración final (mM)	Características relevantes
Genisteína	2 mM	500 μ M	Inhibidor general de tirosina quinasas
K252a	2 mM	500 μ M	Inhibidor de serina/treonina quinasas
PD98059	2 mM	500 μ M	Inhibidor de MAP quinasa quinasa
KN62	2 mM	500 μ M	Inhibidor de calmodulina (CaM) kinasa II
EGTA	50 mM	2 mM	Quelante de iones Ca^{++}
W7 ⁽¹⁾	150 mM	2 mM	Inhibidor de la calmodulina
W5 ⁽²⁾	150 mM	2 mM	Inhibidor de la calmodulina, análogo a W7, pero menos potente.

⁽¹⁾hidrocloruro de N - (6 - aminohexil) - 5 - cloro - 1 - naftanosulfamida.

⁽²⁾hidrocloruro de N - (6 - aminohexil) - 1 - naftalensulfonamida.

Ensayo de fosforilación en gel.

Se siguió la metodología descrita por **Nakamura et al. (1995)** con ciertas modificaciones. En primer lugar, se prepararon dos geles de poliacrilamida de 0,75 mm de grosor al 12% mezclado con 100-150 μ g de la proteína recombinante unida a GST.

Gel de separación*	Gel de empaquetamiento*		
	12%	4%	
Acrilamida/bisacrilamida 40% 29:1	1,125 mL	Acrilamida/bisacrilamida 40% 29:1	187,5 μ L
H ₂ O destilada	1,440 mL	H ₂ O destilada	1,194 mL
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	0,95 mL	Tris-HCl 0,5M pH 6,8	472,5 μ L
APS 10% (m/v)	50 μ L	APS 10% (m/v)	15 μ L
TEMED	2,5 μ L	TEMED	2 μ L

*No se añadió SDS para no desnaturalizar las proteínas. Una gran limitación de este tipo de ensayos es la imposibilidad de detectar quinasas que no se pueden renaturalizar una vez que han sido tratadas con SDS (Heal *et al.*, 2000).

Posteriormente, se cargó en cada gel una alícuota de 100-150 μ g de proteínas procedentes del extracto purificado de la raíz de soja. Las muestras no se hirvieron para no desnaturalizar las proteínas. Los geles inmersos en tampón de electroforesis 1X se corrieron a 100 V en cubetas Mini Protean II y Protean II (Bio-Rad) a 4 °C hasta que el colorante alcanzó el borde inferior del gel. Ambos geles se procesaron y corrieron al mismo tiempo para que sus características (temperatura, voltaje, concentración de proteínas, etc.) fuesen idénticas. Una vez terminada la electroforesis, uno de los geles (gel I) se fijó con solución de fijación, se lavó con agua Milli-Q, se tiñó con azul de Coomassie (Page Blue, Fermentas, EEUU) y se lavó con agua de nuevo. Este gel fue el que se usó para mandar a secuenciar la zona en la que apareció señal de fosforilación en el gel gemelo. El otro gel (gel II) se lavó dos veces con tampón I en agitación suave a 4 °C. A continuación, se sumergió en tampón II y se incubó durante 60 minutos en agitación a 4 °C. Ambos tampones se usaron para retirar los posibles restos de SDS que pudiera haber en el material utilizado. Tras esto, se incubó durante toda la noche en la solución III en agitación suave a 4 °C para conseguir renaturalizar las proteínas que pudieran sufrir una desnaturalización durante el proceso. Al día siguiente, el gel se preincubó durante una hora a 22 °C sumergido en la solución IV y, posteriormente, se incubó durante dos horas a 22 °C en 6 mL del tampón anterior conteniendo 10-20 μ Ci de ATP (γ -32P). Para eliminar los restos de ATP radiactivo se lavó el gel 5 veces con la solución V.

El gel II se tiñó con azul de Coomassie (Page Blue, Fermentas) durante al menos una hora. Seguidamente, se destiñó con agua ultrapura, se incubó durante 30 minutos en tampón de secado, se incubó durante 15 minutos en una solución de amplificación de la señal, se colocó sobre papel Whatmann y se secó durante dos horas aproximadamente. Transcurrido este tiempo, se colocó sobre una placa fotográfica que se almacenó en un casete de revelado durante al menos 24 horas. La placa se reveló mediante el sistema modular de análisis de imagen Fujifilm LAS-5100 (Fujifilm, Japón).

Soluciones empleadas

Tampón de electroforesis	Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3
Solución de fijación	Isopropanol 25% (v/v), ácido acético glacial 10% (v/v)
Solución I	Tris HCl pH 7,5, 25 mM, isopropanol 20% (v/v)
Solución II	Tris HCl pH 7,5, 25 mM, 1mM DTT*
Solución III	Tris HCl pH 7,5, 25 mM, 1mM DTT*, 2 mM EDTA, 0,04% Tween20 (v/v)
Solución IV	Tris HCl pH 7,5, 25 mM, 1mM DTT*, 1 mM EDTA, 20 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ *
Solución V	Ácido tricloroacético 5% (m/v), pirofosfato de sodio (NaPPi) 1% (m/v)
Tampón de secado	Glicerol 3% (v/v), metanol 40% (v/v), ácido acético 10% (v/v)

*Añadir el DTT y el CaCl₂ en el momento de uso.

Las bandas que contenían las proteínas de interés se recortaron del gel I con la ayuda de una cuchilla, se sumergieron en agua y se secuenciaron mediante espectrometría de masas

2. 13. 3. Ensayo de inmunoprecipitación.

Extracción de proteínas del extracto.

Tres o cuatro hojas de plantas de *N. benthamiana* transformadas con *A. tumefaciens* CV3101, como se describe en el apartado **2. 13. 5. de Material y Métodos**, que contenían los plásmidos necesarios para la expresión de proteínas de fusión a YFP-HA, se trituraron en un mortero con nitrógeno líquido hasta que quedó un extracto pulverizado. Los nervios principales de las hojas se desecharon y el polvo se conservó a -80 °C hasta su uso. Un gramo del polvo de las hojas se mezcló y homogeneizó en un mortero frío con 2 mL de tampón de extracción que contenía 1 mM de EDTA, 10 mM de DTT, 2% de polivinilpirrolidona (PVPP) y una punta de espátula de arena. La mezcla se centrifugó en un eppendorf a 3000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se pasó a otro eppendorf, se centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo eppendorf. Finalmente, las proteínas del extracto se cuantificaron con el método Bradford.

Solución empleada

Tampón de extracción	Tween20 1%, Tris HCl pH 7,5 100 mM, NaCl 150 mM, Glicerol 10%
----------------------	---

Unión del anticuerpo a la resina.

La inmunoprecipitación se llevó a cabo usando el kit Pierce Spin Columns (Thermo Scientific, EEUU) con ciertas adaptaciones. Se depositaron 20 μ L de resina (Aminolink plus) sobre el filtro de una columna del kit. La columna, colocada sobre un eppendorf sin tapón, se centrifugó a 1000 g durante un minuto y se retiró el eluyente. A continuación, la resina se lavó dos veces con 300 μ L de Coupling Buffer (CB), centrifugando la muestra a 1000 g durante 1 minuto y retirando el eluyente. Tras esto, se colocó el tapón inferior de la columna y se añadió el anticuerpo diluido en CB. Se usaron 2 μ g de IgG de ratón para el control negativo o 4 μ g de anticuerpo anti-HA para la muestra a analizar. Se añadieron 6 μ L de NaCNBH₃ 2,5 M a la columna, se colocó el tapón superior y se incubó la columna en el interior de un tubo Falcon de 50 mL en un agitador orbital a temperatura ambiente durante 2 horas y media. Tras la incubación, se retiró el tapón inferior y se aflojó el de la parte superior de la columna. A continuación, la columna se colocó en un eppendorf de 1,5 mL y se centrifugó a 1000 g durante un minuto. Seguidamente, se retiró de la columna el tampón superior, se añadieron 200 μ L de CB, se centrifugó a 1000 g durante un minuto y se descartó el eluyente. Este paso se repitió una vez más. Tras esto, se añadieron 200 μ L de Quenching Buffer (QB) y se volvió a centrifugar a 1000 g durante un minuto, descartando el eluyente y secando la parte inferior de la columna en un papel de filtro para eliminar los restos de tampón.

En el siguiente paso, se colocó el tapón inferior, se añadieron 200 μ L de QB, se resuspendió la resina con pipeta suavemente y se añadieron 8 μ L de NaCNBH₃ 2,5 M. Se le colocó el tapón superior a la columna, se introdujo en un tubo Falcon de 50 mL y se incubó en un orbital durante 30 minutos. Posteriormente, se retiró el tapón inferior, se aflojó el superior, se colocó la columna en un tubo eppendorf de 1,5 mL y se centrifugó a 1000 g durante un minuto, descartando el eluyente. Este paso se repitió una vez más para asegurar el bloqueo de la resina. Finalmente, se lavó la resina dos veces con CB y seis veces con Wash Buffer (WB), centrifugando a 1000 g durante un minuto en cada paso.

Inmunoprecipitación.

La resina se lavó dos veces con tampón de extracción, el mismo que se usó para la extracción de proteínas de las hojas de tabaco, se centrifugó a 1000 g durante un minuto en cada lavado y se le colocó el tapón inferior. A continuación, se añadió un volumen de entre 300 y 600 μ L del extracto de hojas de tabaco que contenía entre 500 y 1000 μ g de proteínas. Se colocó el tapón superior a la columna y se incubó en el interior de un tubo Falcon de 50 mL en un agitador orbital a 4 °C durante toda la noche.

Al día siguiente, se retiró el tampón inferior a la columna y se aflojó el superior, se centrifugó a 1000 g durante un minuto y se descartó el eluyente. El tapón superior se retiró, se colocó la columna en un eppendorf limpio, se añadieron 200 μ L de tampón de extracción y se centrifugó a 1000 g durante un minuto. Este último paso se repitió 8 veces para lavar la resina y estar seguros de retirar todas las proteínas que no estén unidas con gran afinidad a la proteína de fusión a YFP-HA. La resina se lavó 8 veces con 200 μ L de una solución de bicarbonato amónico a una concentración de 50 mM para retirar las sales que puedan interferir con la posterior secuenciación de las proteínas. Por último, el tubo se centrifugó a 5000 g durante un minuto, se retiró el sobrenadante y se presionó el filtro hacia abajo con una punta amarilla para que la resina se depositase en el fondo de un eppendorf limpio y, finalmente, la muestra inmunoprecipitada se conservó en 200 μ L de la solución de bicarbonato amónico a 4 °C.

Soluciones empleadas

Coupling buffer (CB)	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O 0,01 M, NaCl 0,15 M pH 7,2
Cianoborohydride solution*	NaCNBH ₃ 2,5 M en NaOH 1 M
Quenching buffer (QB)	Tris-HCl 1 M pH 7,4
Wash solution (WS)	NaCl 1 M
Tampón de extracción	Tween20 1%, Tris HCl pH 7,5 100 mM, NaCl 150 mM, Glicerol 10%
Tampón bicarbonato	NH ₄ HCO ₃ 50 mM

*Preparar al menos 1h antes de su uso

2. 13. 4. Secuenciación de las proteínas.

Las bandas de los geles de poliacrilamida que contenían las proteínas de interés se recortaron con la ayuda de una cuchilla y se sumergieron en agua Milli-Q y se procesaron y se secuenciaron a través del servicio de la Unidad de Proteómica de la

Universidad de Córdoba. En el caso de las muestras procedentes de las inmunoprecipitaciones, las proteínas inmunoprecipitadas unidas a la resina se procesaron y se secuenciaron en el servicio nombrado anteriormente.

2. 13. 5. Expresión transitoria de genes bacterianos en hojas de *N. benthamiana*.

Preparación del cultivo de Agrobacterium tumefaciens CV3101 para infiltrar.

Inicialmente, se preinoculó una colonia de *A. tumefaciens* CV3101 en 5 mL de medio LB con los antibióticos adecuados y se incubó a 28 °C en agitación durante 48 horas. Posteriormente, se inocularon 100 µL del cultivo en 5 mL de LB con 10 mM de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES) y 40 µM de acetosiringona. La mezcla se incubó a 28 °C, en agitación, durante alrededor de 16 horas, hasta que la densidad óptica a 600 nm fue de alrededor de 1. El cultivo se centrifugó a 4000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante, el pellet se lavó con 5 mL de MgCl₂ 10 mM y se volvió a centrifugar el tubo a 4000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió en un volumen de MgCl₂ 10 mM en el que la densidad óptica a 600 nm fue de 0,5-1 y se añadieron los compuestos MES a 10 mM y acetosiringona a 150 µM. La mezcla se incubó a temperatura ambiente, en estático, durante 3 horas.

Infiltración de las hojas de N. benthamiana.



Figura 11. Hojas de *N. benthamiana* enumeradas por orden de altura.

Las plantas de tabaco se cultivaron en macetas durante alrededor de 3 semanas para que el tamaño y la consistencia de las hojas facilitaran la manipulación. A las hojas enumeradas como 3, 4 y 5 (**Figura 11**) se les realizó una pequeña herida con una aguja en el envés y con una jeringuilla de 2 mL (sin aguja) se inoculó un volumen determinado de cultivo presionando al mismo tiempo el haz de la hoja para que el cultivo penetrara en las capas del tejido epidérmico (**Zhou et al., 2009**).

Posteriormente, las plantas se cultivaron en las condiciones apropiadas durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se tiñeron los núcleos de las células mediante la

infiltración del colorante diamina fenil indol (DAPI), de la misma forma y en los mismos puntos de las hojas en los que se infiltró el cultivo días antes, usando un stock a 5 mg mL^{-1} diluido en tampón TBS a una concentración de 1:1000 (v/v). Este marcaje se realizó una hora antes de someter las muestras a microscopía confocal (**Kapusinski y Skoczylas, 1977**).

Solución empleada

Tampón TBS	Tris HCl pH 7,5 100 mM, NaCl 150 mM
------------	-------------------------------------

Uso del microscopio confocal.

Se realizó en colaboración con Carlos Medina Morillas del Departamento de Microbiología. Centro Andaluz de Biología del Desarrollo o CABD de Universidad Pablo de Olavide. Se realizaron cortes de 1 cm x 1 cm de las zonas cercanas a los puntos de infiltración evitando las nerviaciones. Las muestras se colocaron en un portaobjetos con el envés hacia arriba. Se le añadió H₂O destilada, se colocó un cubreobjetos y se selló. Las muestras se visualizaron en un microscopio Leica SP2 Laser Scanning Confocal Microscope (Leica Microsystems, Alemania).

2. 13. 6. Estudio de la translocación de los efectores riobianos al interior de la célula de la raíz de la planta.

El estudio se realizó mediante la cuantificación de la concentración de AMP cíclico (AMPc), producto generado por la enzima adenilato ciclasa que usa como sustrato de la reacción el ATP. Para ello se siguió la metodología descrita por **Schechter et al. (2010)** y **Wenzel et al. (2010)** con ciertas modificaciones. En primer lugar se fusionó el dominio amino terminal de 1218 pb del gen de la adenilato ciclasa (*cya*) de *Bordetella pertusis* al extremo amino del gen que codifica para el efector de estudio. La fusión se clonó en el plásmido pK18*mob* y se integró en el genoma de HH103 mediante conjugación y recombinación simple. Posteriormente, 18 semillas de soja Williams germinadas se colocaron en vasos de precipitado de cristal estériles que contenían 500 mL de vermiculita y 150 mL de solución Fåhraeus 1X. Cada semilla germinada se inoculó con 1 mL de cultivo bacteriano crecido en medio YM que presentaban una densidad óptica a 600 nm de alrededor de 0,8. En estos estudios las semillas se inocularon con la estirpe silvestre HH103 y las estirpes HH103 y HH103 *ttsI::Ω* que

contenían la fusión *nop-cya* integrada en el genoma bacteriano). La concentración de AMPc se midió en los nódulos de la raíz a los 18 d.p.i. utilizando el kit Cyclic AMP EIA (Cayman Chemical Company, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante. La metodología desarrollada por el kit se basa en la competición del AMPc (producido en presencia de la enzima adenilato ciclasa) y de un conjugado (AMPc-AChE), cuya concentración celular es constante, por la unión a un anticuerpo primario específico para AMPc. Las placas de ensayo contenían a su vez un anticuerpo secundario capaz de unirse al primario, independientemente de que estuviera unido al AMPc o al AMPc-AChE. Posteriormente, la placa se lavó y se llevó a cabo la reacción de Ellman y, por último, se midió la absorbancia a 412 nm. La reacción de Ellman se basa en la producción de color amarillo como consecuencia de la presencia de AMPc-AChE en la placa. Por lo tanto, mientras más intenso sea el color amarillo menos AMPc se habrá acumulado, y viceversa.

2. 13. 7. Actividades enzimáticas.

Medida de la actividad catalasa.

La actividad catalasa se determinó usando el método de **Beers y Sizer (1952)**, que mide la eliminación del H_2O_2 por el enzima catalasa dando lugar a H_2O y O_2 . Las plantas de soja Williams, no inoculadas o inoculadas con las estirpes adecuadas, se cultivaron en el sistema de hidroponía en vasos de precipitado. Tras el cultivo, las raíces de las plántulas o plantas se pulverizaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a $-80^\circ C$ hasta su uso. Posteriormente, se tomaron 0,2 g de extracto y se homogenizaron en un mortero con 2 mL de tampón de extracción, se centrifugó a $4^\circ C$ a 11000 g durante 10 minutos, recuperando el sobrenadante en otro tubo eppendorf que contenía 0,58 g de $SO_4(NH_4)_2$. La muestra se centrifugó a $4^\circ C$ a 10500 g durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 220 μL de tampón de extracción. La actividad enzimática se midió con 1 mL de mezcla de reacción y 100 μL de la muestra. Se midió el descenso de la absorbancia a 240 nm que produce el consumo del H_2O_2 en la cubeta durante 2 minutos. La actividad catalasa se expresó en U/mg y se estimó utilizando el coeficiente de extinción molar del H_2O_2 ($39,58 M^{-1} cm^{-1}$), el volumen de la muestra empleado y la concentración de proteínas obtenida con el método Bradford.

Soluciones empleadas

Tampón de extracción	Tampón fosfato potásico 60 mM pH 7, EDTA 0,1 mM
Mezcla de reacción	Tampón fosfato potásico 60 mM pH 7, H ₂ O ₂ 30 mM, 100 μ L muestra

Medida de la actividad superóxido dismutasa (SOD) en gel.

La actividad SOD en gel se determinó utilizando los métodos descritos por **Beauchamp y Fridovich (1971)** y **Chipps *et al.* (2005)** con ciertas modificaciones. Las plantas de soja Williams, no inoculadas o inoculadas con las estirpes adecuadas, se cultivaron en el sistema de hidroponía en vasos de precipitado. Tras el cultivo de las plantas, las raíces de las plántulas o plantas se pulverizaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Posteriormente, se tomaron 0,2 g de extracto y se homogenizó en un mortero con 2 mL de tampón de extracción, se centrifugó a 4 °C a 11000 g durante 10 minutos, recuperando el sobrenadante en otro eppendorf que contenía 0,58 g de SO₄(NH₄)₂. La muestra se centrifugó a 4 °C a 10500 g durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 100 μ L de tampón de extracción, se cuantificó la concentración de las proteínas mediante el método Bradford y se añadió a la muestra glicerol al 20 % (v/v) y azul de bromofenol al 0,05% (m/v). Seguidamente, se cargó en un gel de poliacrilamida al 12,5% la misma cantidad de proteínas de los diferentes tratamientos que se ensayaron. No se hirvieron las muestras para no desnaturalizar las proteínas. La electroforesis se llevó a cabo a 90 V hasta que el frente alcanzó la parte inferior del gel. Por último, se realizó la tinción con NBT, que consistió en incubar el gel durante 20 minutos en la solución I y los 15 minutos siguientes en la solución II, en condiciones de oscuridad y a 4 °C. Para revelar el gel, éste se iluminó con luz blanca durante 5-15 minutos.

Soluciones empleadas

Tampón de extracción	Tampón fosfato potásico 60 mM pH 7,8, 1 M NaCl, 0,1 mM EDTA
Solución I	NBT 2,45*10 ⁻³ M diluido en dimetilformamida al 70 %
Solución II	TEMED 0,028 M y riovflavina 2,8*10 ⁻⁵ M (diluidos en tampón fosfato potásico 36 mM pH 7,8)

3. Material y Métodos relacionados con levaduras.

3. 1. Levaduras y plásmidos.

Se usó una colección de mutantes derivados de la estirpe silvestre *Saccharomyces cerevisiae* BY474 dispuestos en una placa microtítulo de 96 pocillos (construida por el **Dr. Eran Bosis** y cedido por el Dr. Sessa del Departamento de Biología Molecular y Ecología de Plantas. Universidad de Tel Aviv. Israel (**Tabla 12**). Cada uno de estos mutantes y las distintas copias de la estirpe silvestre dispuestas en la placa (*array*) se transformaron con los plásmidos pGML10, pMUS1183 (*nopL* clonado en pGML10) y pMUS1184 (*nopP* clonado en pGML10), obtenidos mediante la extracción de ADN plasmídico a partir de las correspondientes estirpes de DH5 α .

Tabla 12. Array de mutantes de *S. cerevisiae* BY4741 usados en esta Tesis.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<i>dep1</i>	<i>ctf8</i>	<i>cin8</i>	<i>vps71</i>	<i>spo13</i>	<i>las21</i>	<i>nup133</i>	<i>nup2</i>	<i>sto1</i>	<i>chs1</i>	<i>top1</i>	<i>kes1</i>
B	<i>ccr4</i>	<i>swf1</i>	<i>bim1</i>	<i>mad1</i>	<i>slt2</i>	<i>bck1</i>	<i>ric1</i>	<i>fks1</i>	<i>jnn1</i>	<i>rtt106</i>	<i>htz1</i>	<i>cbc2</i>
C	<i>lte1</i>	<i>gim3</i>	<i>mot2</i>	<i>kem1</i>	<i>ire1</i>	<i>set2</i>	<i>arp6</i>	<i>dcr2</i>	<i>gas1</i>	<i>rpa49</i>	<i>bub3</i>	<i>alg5</i>
D	<i>chs3</i>	<i>nbp2</i>	<i>kar3</i>	<i>spt4</i>	<i>lrp1</i>	<i>pf1d1</i>	<i>hog1</i>	<i>cdc73</i>	<i>hda1</i>	<i>bni1</i>	<i>sti1</i>	<i>hsp82</i>
E	<i>slx5</i>	<i>eaf1</i>	<i>swi4</i>	<i>pac10</i>	WT	<i>hoc1</i>	<i>yke2</i>	<i>rps17a</i>	<i>ydj1</i>	<i>cla4</i>	<i>dia2</i>	<i>ctf4</i>
F	<i>rpn4</i>	<i>esc2</i>	<i>hac1</i>	<i>dbf2</i>	<i>arp1</i>	<i>nup120</i>	<i>ypt6</i>	<i>rad52</i>	<i>ras2</i>	<i>kre1</i>	<i>npt1</i>	<i>kre6</i>
G	<i>arf1</i>	WT	<i>psd1</i>	<i>smi1</i>	<i>air1</i>	<i>rad27</i>	<i>sec22</i>	<i>gim5</i>	<i>yaf9</i>	<i>rpd3</i>	<i>lge1</i>	<i>hda3</i>
H	<i>gcs1</i>	<i>gim4</i>	<i>dst1</i>	<i>gcn5</i>	<i>mad2</i>	<i>cnb1</i>	<i>chs5</i>	<i>csm3</i>	WT	<i>pop2</i>	<i>elp3</i>	WT

3. 2. Método y solución de congelación.

Tras cultivar las levaduras en las placas microtítulo en los medios apropiados, la biomasa procedente de 200 μ L de cultivo de cada pocillo se resuspendió en 150 μ L de una solución compuesta de peptona al 0,5% (m/v) y de glicerol al 15% (v/v) esterilizada en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 $^{\circ}$ C). Las levaduras así preparadas se conservaron a -80 $^{\circ}$ C.

3. 3. Medios de cultivo para *S. cerevisiae*.

Para cultivar *S. cerevisiae* BY4741 se utilizó el medio rico Yeast Peptone Dextrose (YPD) y un medio completo selectivo suplementado con glucosa al 2% (medio represor), o sacarosa al 2% y rafinosa al 1 % (medio activador). Los cultivos líquidos se incubaron en agitación a 180 r.p.m.. Los medios se solidificaron, cuando fue necesario, añadiendo 20 g L⁻¹ de Bacto-agar. En ambos casos la temperatura de incubación fue de 30 °C.

YPD (Ausubel *et al.*, 1994)

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Glucosa	20 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

El pH se ajustó a 7,0 y el medio se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (115 °C).

Medio completo sintético selectivo (Salomon y Sessa, 2010)

(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
Yeast Nitrogen Base (YNB)	1,7 g
Glucosa*	20 g
Sacarosa*	20 g
Rafinosa*	10 g
Suplemento DO -Leu/-Trp	0,64 g
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	1,023 g
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	0,67 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

El pH se ajustó a 7,0 usando NaOH 10 M y el medio se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (115 °C). *Al medio se le añadió glucosa al 2 % o una mezcla de sacarosa al 2 % y rafinosa al 1 %.

3. 4. Transformación en *S. cerevisiae*.

Se siguió el protocolo descrito por **Bosis *et al.* (2011)** con ciertas modificaciones. Se partió del array de *S. cerevisiae* que se presenta en la **Tabla 12**. Las levaduras se sembraron en una placa microtítulo de 96 pocillos que contenía 200 µL del medio YPD sólido y se incubó durante dos o tres días a 30 °C. Posteriormente, se inoculó biomasa de cada pocillo en una nueva placa microtítulo de 96 pocillos que contenía 150 µL de YPD líquido en cada pocillo y se incubó durante toda la noche a 180 r.p.m. a 30 °C. Transcurrido este tiempo, la placa se centrifugó a 700 g durante 5 minutos descartando el sobrenadante. Las levaduras se resuspendieron en 100 µL de agua destilada estéril y

25 μL de la resuspensión de cada pocillo se transfirió a otra placa microtítulo de 96 pocillos, a la que previamente se le añadió 75 μL de agua destilada estéril. La placa se centrifugó a 700 g durante 5 minutos descartando el sobrenadante. Seguidamente, las levaduras se resuspendieron en 50 μL de una mezcla de transformación (0,3 M LiAc pH 7,5, 1 mg mL^{-1} de esperma de salmón previamente hervido, y 4 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ del plásmido) y se añadió a cada pocillo 100 μL de polietilenglicol al 50% (m/v). La placa se introdujo en una bolsa de plástico, se selló y se incubó en un baño a 42 °C durante dos horas. Tras esto, se añadió a cada pocillo 10 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) estéril y se volvió a incubar en las mismas condiciones durante 30 minutos más.

La placa se centrifugó a 1500 g durante 10 minutos descartando el sobrenadante. Se añadieron a cada pocillo 100 μL de agua destilada estéril y se centrifugó a 700 g durante 5 minutos, retirando el sobrenadante. Este último paso se realizó dos veces más para lavar las células antes de sembrarlas en el medio correspondiente. Tras el lavado, las levaduras se resuspendieron en 10 μL de agua destilada estéril y se sembraron en un medio completo selectivo (sin leucina) sólido y suplementado con glucosa al 2%. La placa se incubó a 30 °C durante dos o tres días.

3. 5. Determinación de la función de efectores del T3SS mediante el uso de un *array* de levaduras.

Fundamento de la técnica.

Se utilizó la metodología descrita por **Bosis *et al.* (2011)** con ciertas modificaciones. La técnica se basa en la doble mutación deletérea de las levaduras o interacción sintética letal (SL, del inglés, Synthetic Lethality), que se define como aquella situación en la que dos genes, no vitales para la levadura cuando se encuentran mutados individualmente, causan letalidad cuando están mutados al mismo tiempo. Para ello se expresaron algunos genes de los efectores del T3SS de *S. fredii* HH103, clonados en el plásmido pGML10, en el *array* de levaduras de la **Tabla 12**. La colección de estirpes está compuesta por 4 réplicas de la estirpe silvestre *S. cerevisiae* y 92 cepas derivadas que poseen una mutación concreta. Cada mutación afecta a una ruta metabólica principal del microorganismo y cada uno de los genes afectados pueden presentar, al menos, una interacción SL conocida. Como se comentó con anterioridad, estas mutaciones aisladas no son deletéreas, sin embargo, si el efector expresado en dicho mutante afecta a la ruta

alternativa que tiene una función vital junto al gen que se encuentra mutado, el crecimiento de esa cepa se verá comprometido. Finalmente, a partir de todos aquellos mutantes hipersensibles al efector, es decir, cuyo crecimiento se ve afectado debido a la expresión de éste, se buscaron aquellos genes que fuesen congruentes. Toda la información recogida deberá converger en una única ruta metabólica o diana en la que potencialmente puede interferir el efector de estudio (**Figura 12**).

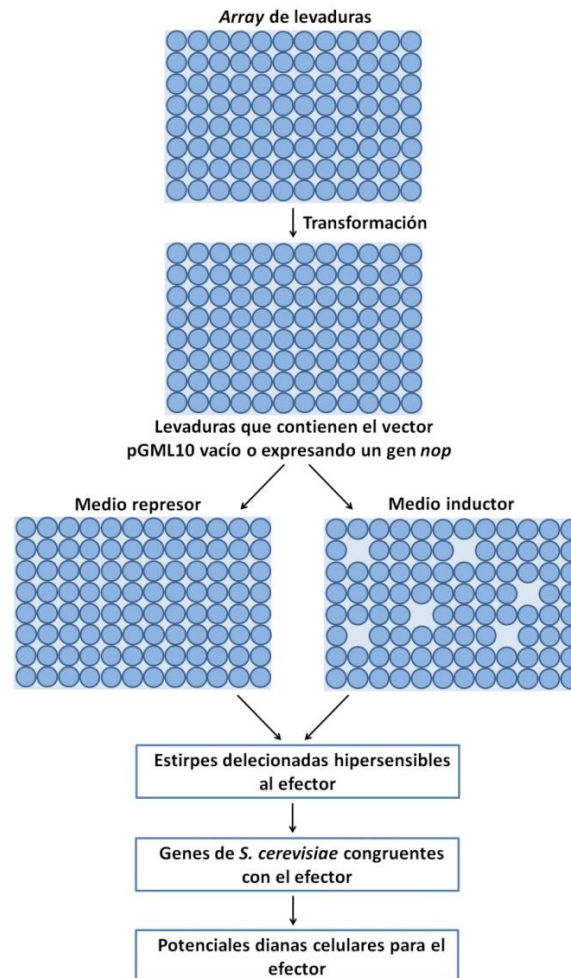


Figura 12. Esquema de la determinación de la función de efectores del T3SS mediante el uso de un *array* de levaduras. Basada en la figura publicada por **Bosis *et al.* (2011)**. El medio represor contenía glucosa y el medio activador contenía sacarosa y rafinosa.

Metodología.

En primer lugar, se partió del *array* de levaduras dispuesto en una placa microtítulo de 96 pocillos transformado con el plásmido pGML10 vacío o portando los genes que codifican para los efectores del sistema del T3SS de HH103. A continuación, se

pipetearon 20 μL de cada pocillo en otra placa que contenía 180 μL de un medio completo selectivo sin leucina y con glucosa. La placa microtítulo se incubó durante 48 horas a 30 °C a 180 r.p.m.. Transcurrido este tiempo y tras comprobar que el cultivo de cada pocillo estaba crecido, se centrifugó la placa durante 5 minutos a 700 g, se resuspendió cada pocillo con 100 μL de agua destilada estéril y se añadieron 10 μL de cultivo de cada pocillo en placas que contenían 90 μL con diferentes medios: medio completo selectivo con glucosa (medio represor) y medio completo selectivo con galactosa (medio activador). Finalmente, las placas se incubaron a 180 r.p.m. a 30 °C durante 48 horas y se midió la densidad óptica a 600 nm en un lector de placas Synergy HT (BioTek, EEUU).

Cálculos para la determinación de los resultados.

Para determinar qué mutantes de *S. cerevisiae* del *array* se vieron afectados por la expresión de un determinado efector del T3SS se realizaron los siguientes cálculos:

I. Ratio inductor/represor (A): se calcula el cociente entre la densidad óptica de una determinada línea de *S. cerevisiae* (un pocillo concreto) crecida en galactosa y la densidad óptica de la misma línea de levadura crecida en glucosa.

$$\mathbf{A = (Ratio\ inductor/represor)}_{\text{de todas las cepas de la placa}}$$

II. Media de los ratios inductor/represor de las cuatro réplicas de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* de una misma placa microtítulo (B).

$$\mathbf{B = Media (Ratio\ inductor/represor)}_{\text{silvestres}}$$

III. Ratio de crecimiento (A/B): cociente del ratio inductor/represor de cada línea de *S. cerevisiae* (A) y la media de los ratios inductor/represor de las cuatro réplicas de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* (B).

$$\mathbf{(A/B) = (Ratio\ inductor/represor)}_{\text{todas las estirpes de la placa}} / \mathbf{Media (Ratio\ inductor/represor)}_{\text{estirpes silvestres}}$$

IV. Se divide el ratio de crecimiento de cada línea de *S. cerevisiae* proveniente del *array* de levaduras que expresan un efector del T3SS entre el ratio de crecimiento de cada línea de *S. cerevisiae* proveniente del *array* de levaduras transformadas con el plásmido pGML10 vacío. Así, el resultado se expresó como el porcentaje de crecimiento de cada mutante respecto a la cepa silvestre.

$$(A/B \text{ efector}) / (A/B \text{ plásmido vacío})$$

Búsqueda de los genes de *S. cerevisiae* congruentes con el efector.

En primer lugar, se seleccionaron los valores de las estirpes cuyo valor final [(AB efector)/(A/B plásmido vacío)] fueron inferiores al 50%, es decir, las estirpes hipersensibles a la presencia del efector del T3SS en al menos dos de las tres réplicas biológicas que se realizaron. Para identificar los genes congruentes para un efector determinado, se elaboró en primer lugar una lista de los genes que fueron sintéticos letales con alguna de las estirpes hipersensibles para el efector, ya que un gen se define como congruente con un efector determinado si el conjunto de interacciones SL solapa con las estirpes hipersensibles para ese efector. Posteriormente, para cada uno de esos genes se calculó el número de interacciones con los genes hipersensibles (solapamiento SL) y el número de posibles interacciones con cada una de las estirpes del *array* (SL total). Esos valores se usaron para calcular la probabilidad de que cada gen comparta interacciones SL con el efector de estudio.

Búsqueda de los genes de *S. cerevisiae* congruentes con el efector.

Los genes congruentes se estudiaron mediante la aplicación web “FuncAssociate 2.1” (<http://llama.mshri.on.ca/funcassociate>) para identificar el o los o procesos celulares (GO attributes) más probables en los que el efector pudiese estar implicado.

Objetivos

- 1. Estudio de la respuesta de defensa temprana inducida por la estirpe *S. fredii* HH103 en la raíz de soja Williams y del papel del T3SS en la supresión de la misma.**
- 2. Caracterización de los genes *nopL*, *nopI* y *nopC* de *S. fredii* HH103.**
- 3. Estudio de la función de las proteínas NopL y NopP de *S. fredii* HH103.**

Resultados

Bloque I

El T3SS suprime la respuesta de defensa temprana en soja, inducida por su simbiote natural *Sinorhizobium fredii* HH103

Antecedentes

Los resultados previos obtenidos por **López-Baena et al. (2009)** demostraron que un mutante afectado en el gen *ttsI* de *S. fredii* HH103, incapaz de secretar proteínas Nop, induce en soja Williams la formación de un número de nódulos significativamente menor que los inducidos por la estirpe parental.

Para determinar si el T3SS estaba involucrado en la respuesta de defensa por parte del hospedador, se midió la expresión de varios genes relacionados con la defensa y se comprobó que tanto la estirpe silvestre HH103 como el mutante HH103 *ttsI::Ω*, incapaz de secretar proteínas Nop, activaron la expresión temprana del gen *GmPRI* en las raíces de soja Williams. Sin embargo, la expresión fue mucho mayor en las plantas inoculadas con la estirpe mutante. Además, únicamente la inoculación con el mutante HH103 *ttsI::Ω* activó la expresión de este gen en las hojas de las plantas de soja, lo que indicaría que se podría tratar de una respuesta de defensa sistémica.

A partir de estos resultados se elaboró un esquema de trabajo en el que se incluyeron una serie de pruebas para estudiar el papel del T3SS en la compleja red de señales relacionadas con la respuesta de defensa de la planta.

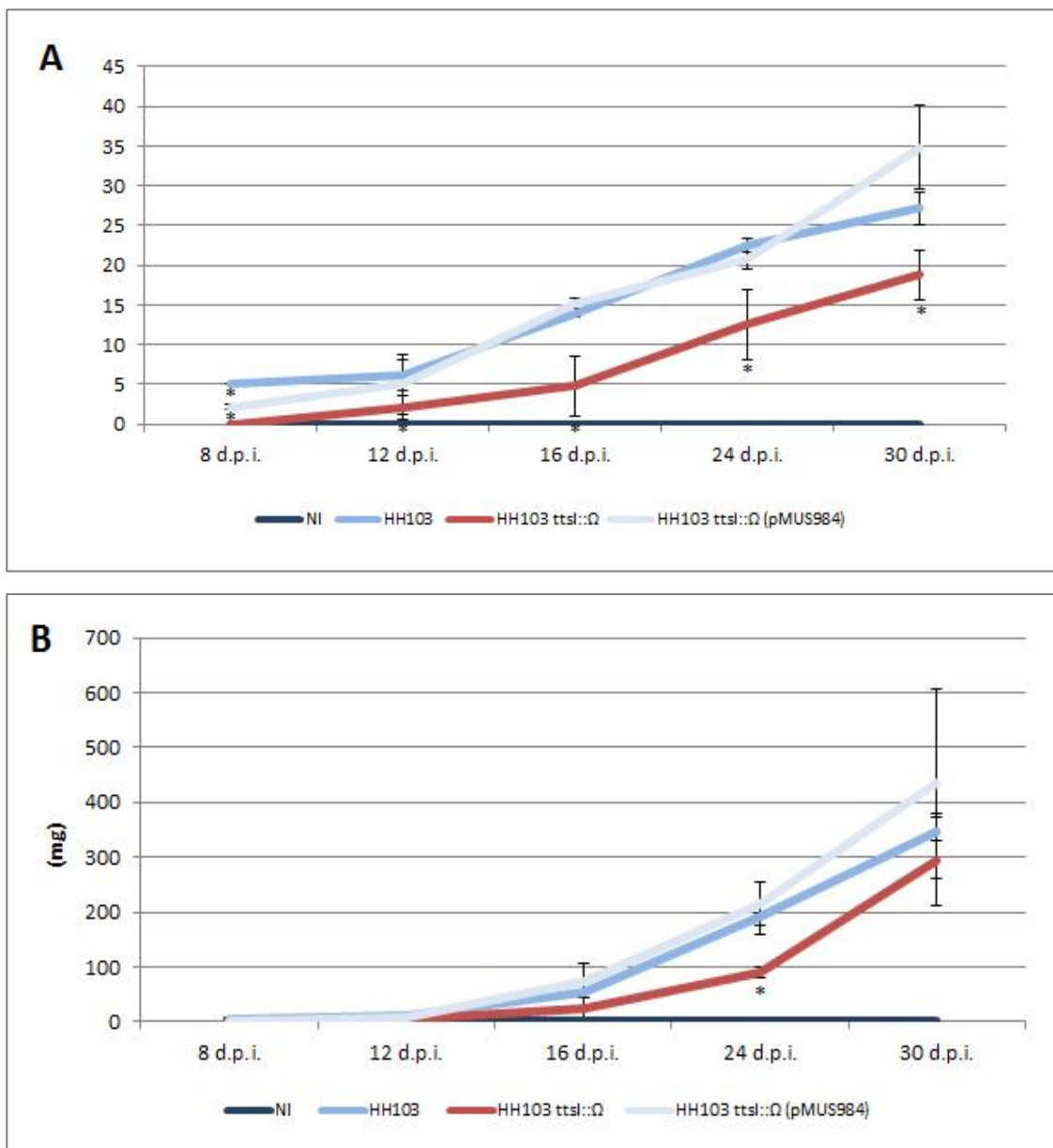
1. La interrupción de la secreción de efectores a través del T3SS de *S. fredii* HH103 genera una disminución y un retraso en la formación de nódulos en soja Williams que están relacionados con una reducción de la expresión de los genes tempranos de nodulación *GmNIN* y *GmENOD40*.

1. 1. Cinética de nodulación de *S. fredii* HH103 en soja Williams.

En primer lugar, para determinar si una posible respuesta de defensa temprana en la soja podría relacionarse con una reducción en el número de nódulos, se realizó una cinética de nodulación. Este ensayo se llevó a cabo en jarros Leonard y las plantas de soja Williams se inocularon con la estirpe silvestre HH103, el mutante HH103 *ttsI::Ω* y su derivado complementado HH103 *ttsI::Ω* (pMUS894). El recuento de los nódulos se realizó a los 8, 12, 16, 24 y 30 días tras la inoculación (d.p.i.).

Los resultados obtenidos mostraron un mayor número de nódulos en las plantas inoculadas con la estirpe parental HH103 con respecto al mutante HH103 *ttsI::Ω* en todos los puntos de la cinética analizados. Además, en las plantas inoculadas con la estirpe parental HH103 aparecieron los primeros nódulos a los 8 d.p.i., mientras que las plantas inoculadas con el mutante HH103 *ttsI::Ω* no desarrollaron nódulos hasta los 12 d.p.i. (**Figura 13, A**). Por tanto, existe un claro retraso en las etapas tempranas del proceso de nodulación causado por la ausencia de las proteínas Nop. Es por esta razón por la que se tomaron los primeros 8 d.p.i. como el intervalo de tiempo para realizar los experimentos posteriores relacionados con la respuesta de defensa de la planta. Por otra parte, se observó una tendencia en la reducción de la masa fresca de los nódulos en las plantas inoculadas con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* con respecto a las inoculadas con la parental HH103 a partir de los 8 d.p.i., haciéndose significativamente menor a los 24 d.p.i. (**Figura 13, B**). Sin embargo, no se observaron diferencias entre los tratamientos en la masa seca de la parte aérea (**Figura 13, C**). Es interesante destacar que en las plantas inoculadas con la estirpe HH103 *ttsI::Ω* se produjo una inhibición del crecimiento de la raíz principal que no se observó en las raíces de las plantas inoculadas con la estirpe silvestre HH103 (**Figura 14**), de forma que los nódulos inducidos por la estirpe HH103 *ttsI::Ω* solo se desarrollaron en las raíces laterales. Este fenotipo se observó de forma más clara cuando las plantas de soja Williams se cultivaron en un

sistema de hidroponía estéril, forma de cultivo desarrollado para experimentos posteriores (**Figura 15**). Por último, en las plantas inoculadas con la estirpe complementada HH103 *ttsI::Ω* (pMUS894) se observó la formación de un número de nódulos similar al inducido por la estirpe parental HH103 y no se detectó la mencionada interrupción del crecimiento de la raíz principal.



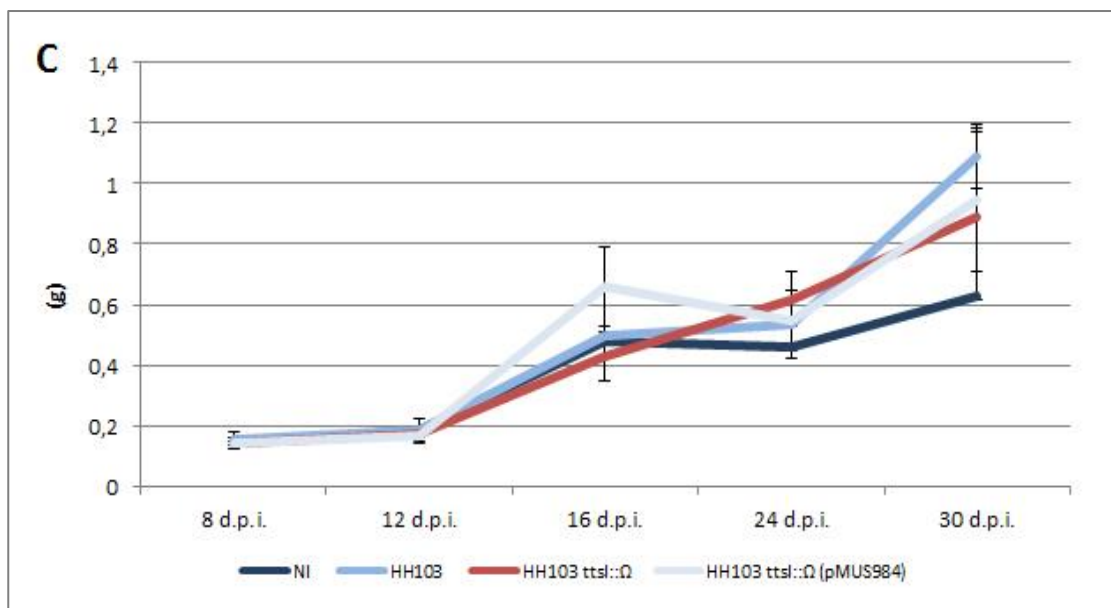


Figura 13. Cinética de nodulación de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984). **A**, número de nódulos. **B**, masa fresca de los nódulos. **C**, masa seca de la parte aérea. Los datos representan la media de 12 plantas. Las bacterias aisladas de 20 nódulos inducidos por cada inoculante mostraron los marcadores de resistencia esperados. Los valores del mutante HH103 *ttsI::Ω* se compararon individualmente con los de la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

En los primeros estadios del desarrollo las plantas de soja se sirven de los nutrientes de los cotiledones para obtener la energía necesaria para soportar su crecimiento y, aunque se estén formando los primeros nódulos, es difícil apreciar diferencias en la parte aérea de la planta entre los distintos tratamientos. Con el fin de apreciar estas diferencias, se realizó la cuantificación de los pigmentos fotosintéticos de las hojas más jóvenes de las plantas en todos los puntos analizados de la cinética de nodulación. Los resultados obtenidos mostraron que en la mayoría de los puntos analizados la concentración de los pigmentos fluctuó de la misma forma, sin apreciarse ningún patrón claro hasta llegar a una reducción considerable y significativa en las plantas inoculadas con el mutante HH103 *ttsI::Ω* con respecto a las plantas inoculadas con la estirpe silvestre HH103 a los 30 d.p.i. (**Figura 16**).

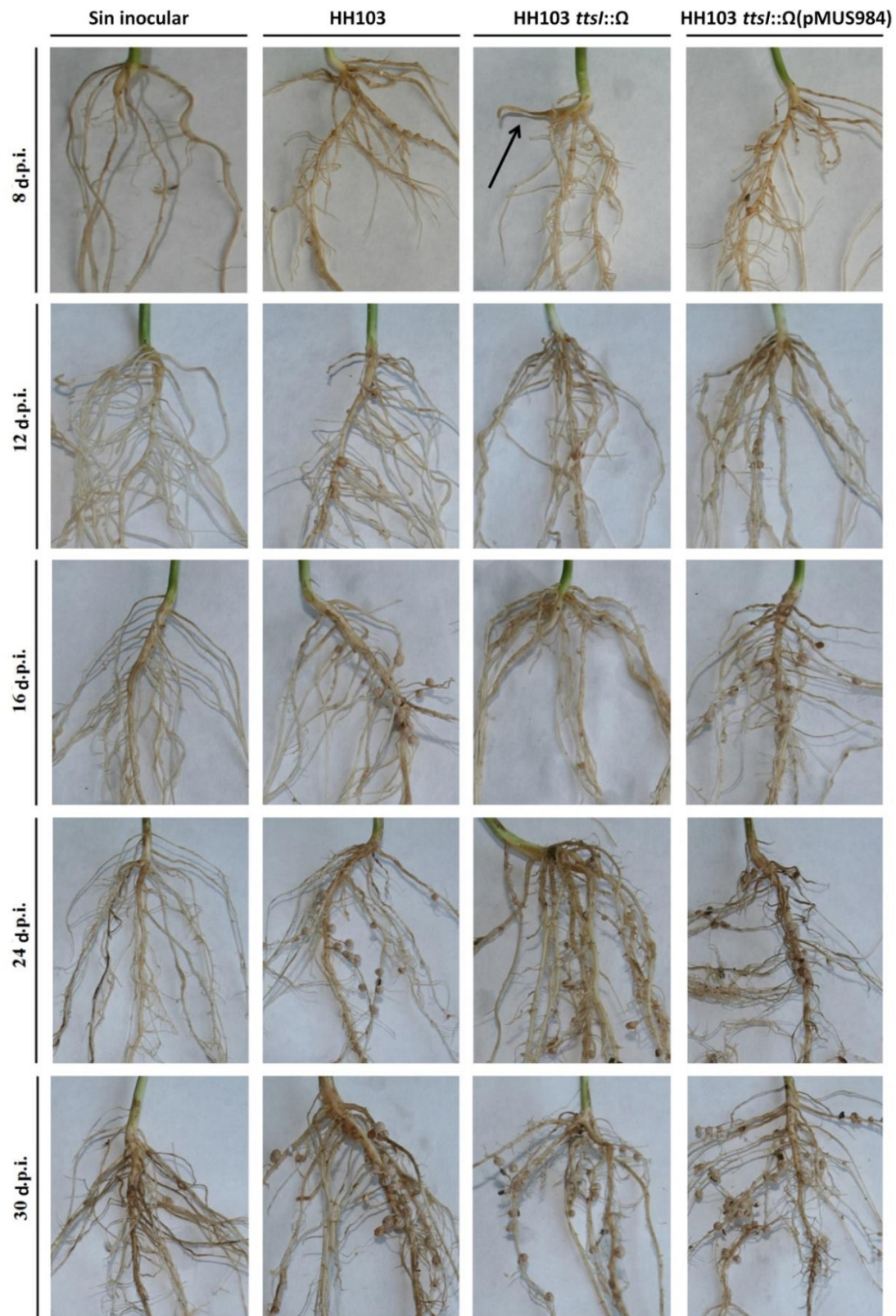


Figura 14. Inhibición del crecimiento de la raíz principal de plantas de soja Williams tras la inoculación con un mutante que no secreta proteínas Nop. Las plantas de soja se cultivaron en vermiculita y se inocularon con las estirpes HH103, HH103 *ttsI*:: Ω y HH103 *ttsI*:: Ω (pMUS984). La flecha indica la interrupción en el crecimiento de la raíz principal.



Figura 15. Inhibición del crecimiento de la raíz principal de plantas de soja Williams tras la inoculación con un mutante que no secreta proteínas Nop. Las plantas de soja se cultivaron en hidroponía en vasos de precipitado y se inocularon con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984). La flecha indica la interrupción en el crecimiento de la raíz principal.

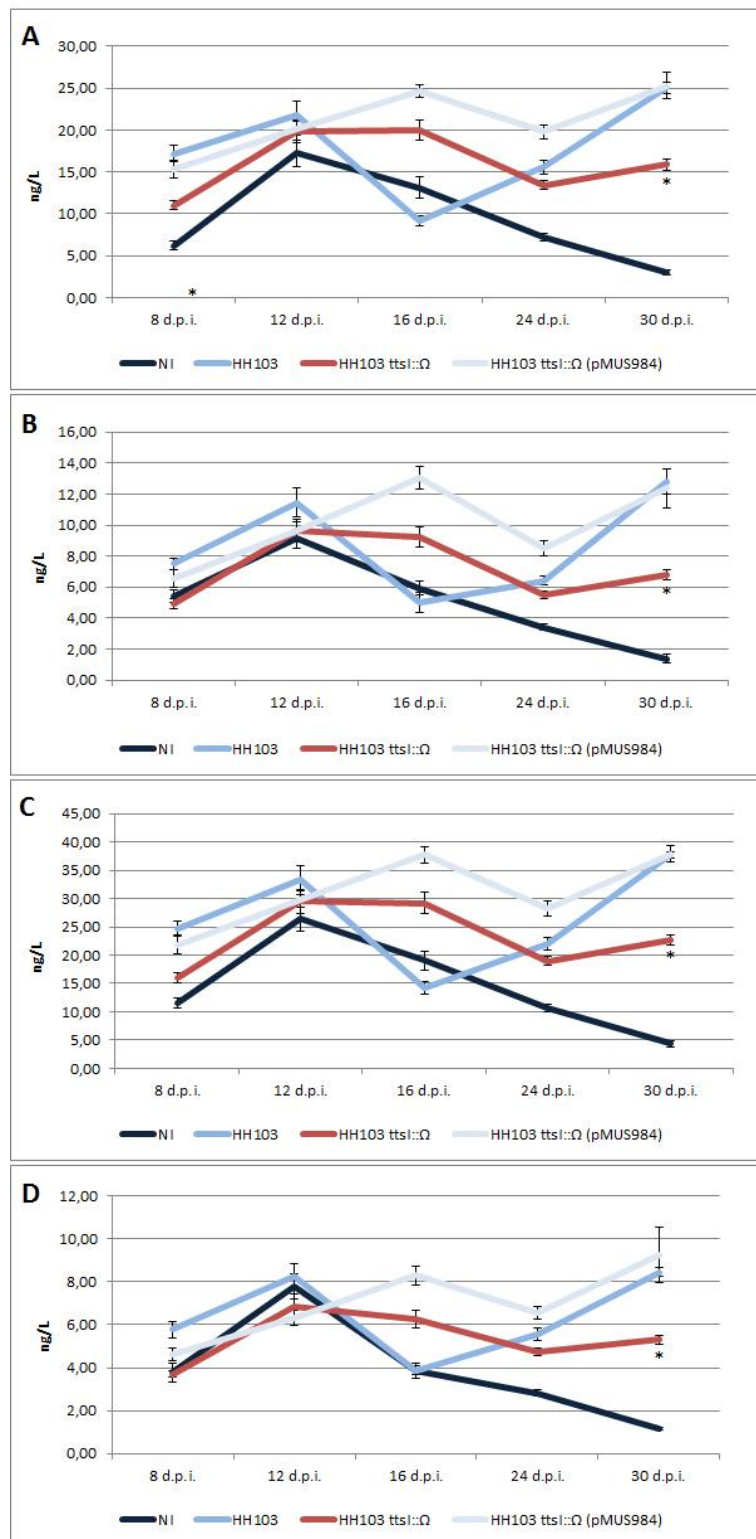


Figura 16. Cuantificación de los pigmentos fotosintéticos de las plantas de soja Williams inoculadas con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984). **A**, clorofila A; **B**, clorofila B; **C**, suma de las clorofilas A y B; **D**, carotenos. Los datos representan las medias de 3 hojas de cada planta de un total de 3 plantas. Los valores de la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* se compararon con los de la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los puntos con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

Como se ha comentado en la introducción, cuando los factores de nodulación son reconocidos por receptores específicos de las plantas hospedadoras se activa la vía temprana de señalización mediada por los factores Nod. La presencia de estas moléculas es un requisito necesario y fundamental para el proceso de entrada de los rizobios en las células del tejido radical, la morfogénesis del nódulo y la fijación simbiótica del nitrógeno dentro de estos nódulos. Entre los genes que se activan en esta vía se encuentran los genes *NIN* y *ENOD*, relacionados principalmente con la formación del tubo de infección y de los nódulos, respectivamente (Geurts *et al.*, 2005; Marsh *et al.*, 2007), y ambos son utilizados como marcadores para estudiar los pasos iniciales de la nodulación. Para determinar en qué momento la inactivación del T3SS afecta al proceso de infección y estudiar si existe alguna relación con el retraso en la nodulación observado en las plantas de soja Williams inoculadas con el mutante HH103 *ttsI::Ω*, se midió la expresión de los genes *GmNINa*, *GmNINb* y *GmENOD40.2*. La cuantificación de estos genes se realizó en las raíces de soja Williams cultivadas en un sistema de hidroponía estéril a los 2, 4 y 8 d.p.i. con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y su derivado complementado HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984).

Los resultados mostraron una activación significativamente mayor de los genes *NIN* en las raíces de las plantas inoculadas con la estirpe parental HH103 con respecto a las inoculadas con el mutante HH103 *ttsI::Ω* durante todo el proceso de infección. Además, se observó que la expresión general de los genes *NIN* disminuye con el tiempo, presentando los máximos niveles de expresión a los 2 d.p.i. y los mínimos a los 8 d.p.i. (Figura 17, A y B). Las diferencias más notables en la expresión del gen *GmENOD40.2* se observaron a los 4 d.p.i., en la que los valores de transcripción del gen fueron significativamente mayores en las plantas inoculadas con la estirpe parental HH103 (64 veces) frente a los producidos por la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* (18 veces). Este fenotipo se restauró en las plantas inoculadas con la estirpe en la que se complementa la mutación. Sin embargo, la expresión de este gen a los 2 d.p.i. y a los 8 d.p.i. presentó valores muy bajos en todos los tratamientos respecto a lo observado a los 4 d.p.i. (Figura 18). Para la complementación de la mutación se utilizó el plásmido pMP92 por lo que no es posible controlar ni la dosis génica ni la estabilidad del plásmido durante el proceso simbiótico, lo que podría ser la causa de que no se complementara completamente la mutación en todos los casos.

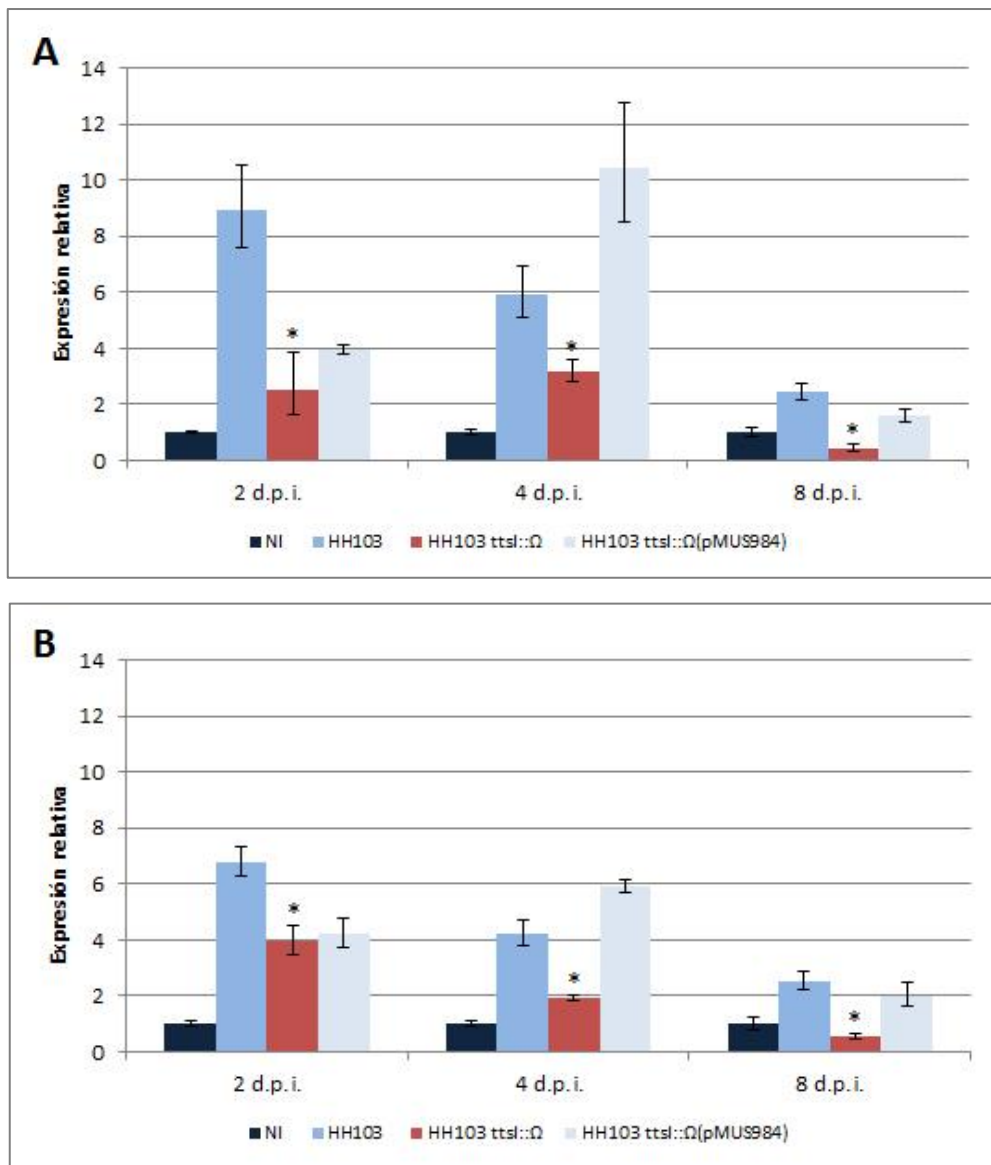


Figura 17. Cuantificación de la expresión relativa de los genes *NIN* de soja Williams en respuesta a la inoculación con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984). **A**, expresión del gen *GmNINa*. **B**, expresión del gen *GmNINb*. Los datos representan las medias de 3 réplicas de 2 extracciones de ARN independientes. El mutante se comparó individualmente con la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

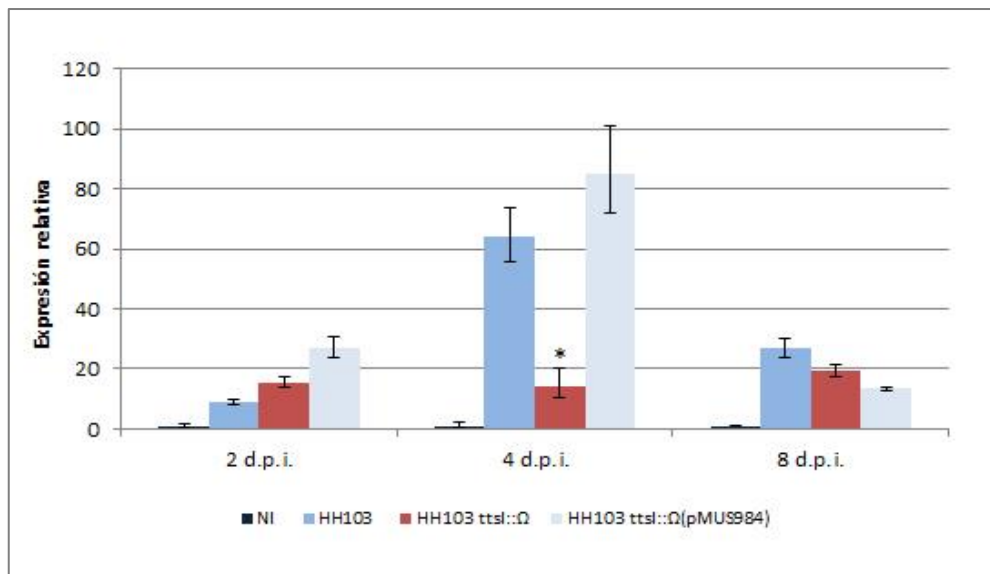


Figura 18. Cuantificación de la expresión relativa del gen *ENOD40.2* de soja Williams en respuesta a la inoculación con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984). Los datos representan las medias de 3 réplicas de 2 extracciones de ARN independientes. El mutante se comparó individualmente con la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

1. 2. Estudio de la expresión *in vivo* de los genes del T3SS de *S. fredii* HH103 en la simbiosis con la soja Williams.

Algunos autores han demostrado que los genes del T3SS se expresan en todos los estadios del proceso de nodulación. Así, los estudios de transcriptómica descritos en el trabajo de **Zehner et al. (2008)** muestran que el T3SS de *B. japonicum* USDA110 se encuentra activo tanto en el tubo de infección como en los nódulos en desarrollo de la soja. Además, se han encontrado transcritos de estos genes de *S. fredii* NGR234 en nódulos maduros de *Cajanus cajan* y *Vigna unguiculata* (**Viprey et al., 1998; Perret et al., 1999**). Otros estudios han demostrado que en *S. fredii* NGR234 los genes del T3SS se activan tras la producción de los factores Nod y se mantienen activos al menos durante 24 horas. Además, el patrón temporal indica que la secreción de proteínas coincide con el desarrollo del tubo de infección (**Deakin y Broughton, 2009**). Los trabajos realizados por **de Lyra et al. (2006)** han demostrado que la expresión *in vitro* del gen *rhcJ* de *S. fredii* HH103 comenzaba alrededor de las 8 horas tras la inducción con flavonoides y después de la activación de la transcripción de los genes *nod*. El nivel

máximo de expresión se alcanzaba a las 20-24 horas, manteniéndose activa la expresión al menos hasta las 40 horas tras la inducción.

La cuantificación de la expresión de los genes regulados por la proteína TtsI *in vivo* se llevó a cabo mediante el uso de la estirpe *S. fredii* HH103 (pMUS1207). Esta estirpe es un derivado de HH103 que contiene el plásmido pMP92 que porta la caja *tts* de la región promotora del operón *nopC-nopA* de *S. fredii* HH103 seguida de los genes *luxCDABE* de *Vibrio fischeri*. Para la construcción del plásmido pMUS1207, el plásmido FLUX se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI y el fragmento de ~5,8 kb correspondiente a los genes *luxCBABE* de *V. fischeri* se clonó en el plásmido pMP92, previamente digerido con las mismas enzimas, generándose el plásmido pMUS1199. Posteriormente, la caja *tts* situada en la región promotora del operón *nopC-nopA* de HH103 se amplificó por PCR utilizando los cebadores *tts*boxC_F y *tts*boxC_R. El amplicón se cortó con las enzimas *Eco*RI y *Hind*III y, finalmente, se clonó en el plásmido pMUS1199, previamente digerido con las mismas enzimas, dando lugar al plásmido pMUS1207. Éste se conjugó en las estirpes HH103, HH103 *nodD1::lacZ-Gm^R* y HH103 *ttsI::Ω*. La estirpe HH103 (pMUS1207) se utilizó como biosensor, mientras que las estirpes HH103 (pMUS1199), HH103 *nodD1::lacZ-Gm^R* (pMUS1207) y HH103 *ttsI::Ω* (pMUS1207) fueron utilizadas como controles para la validación del biosensor. Así, únicamente la estirpe HH103 (pMUS1207) en simbiosis con la soja activó la producción de luminiscencia (**Figura 19**).

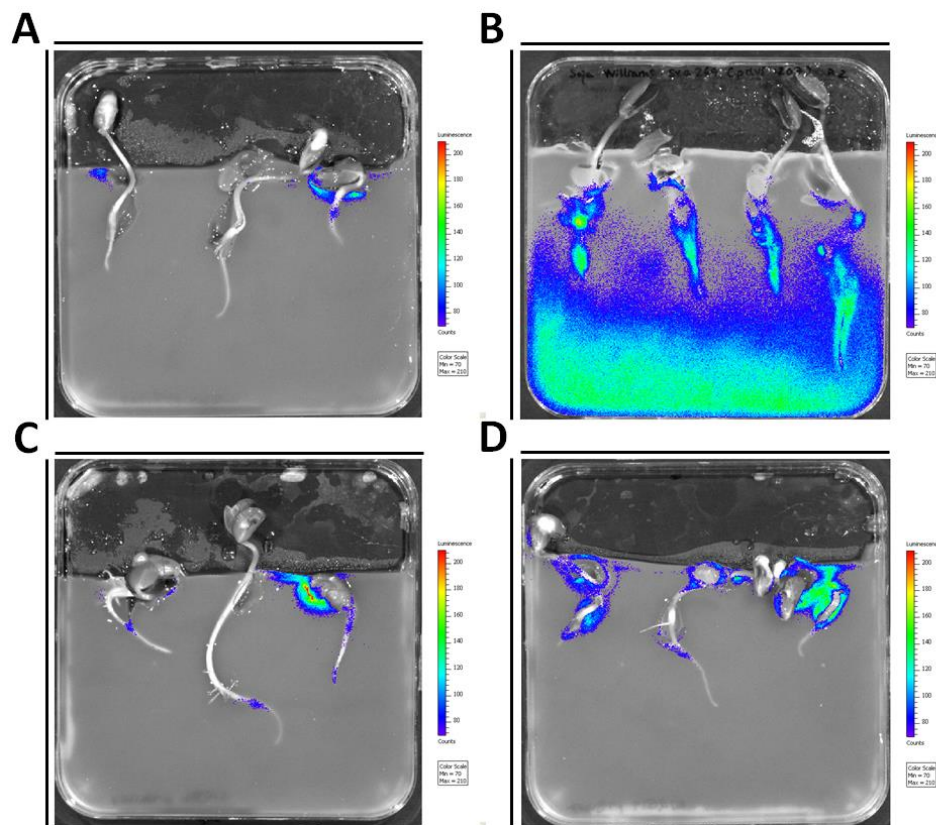
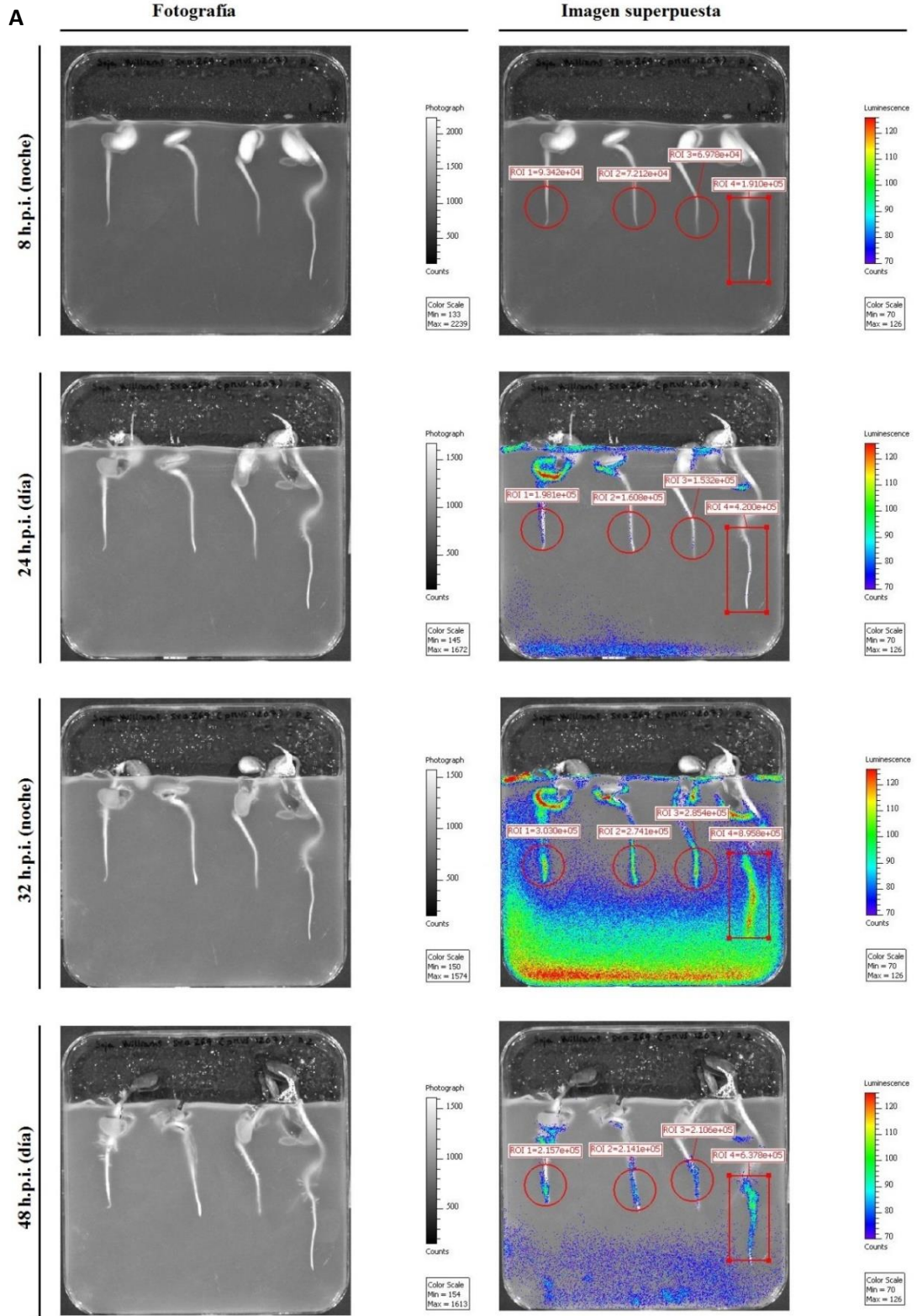
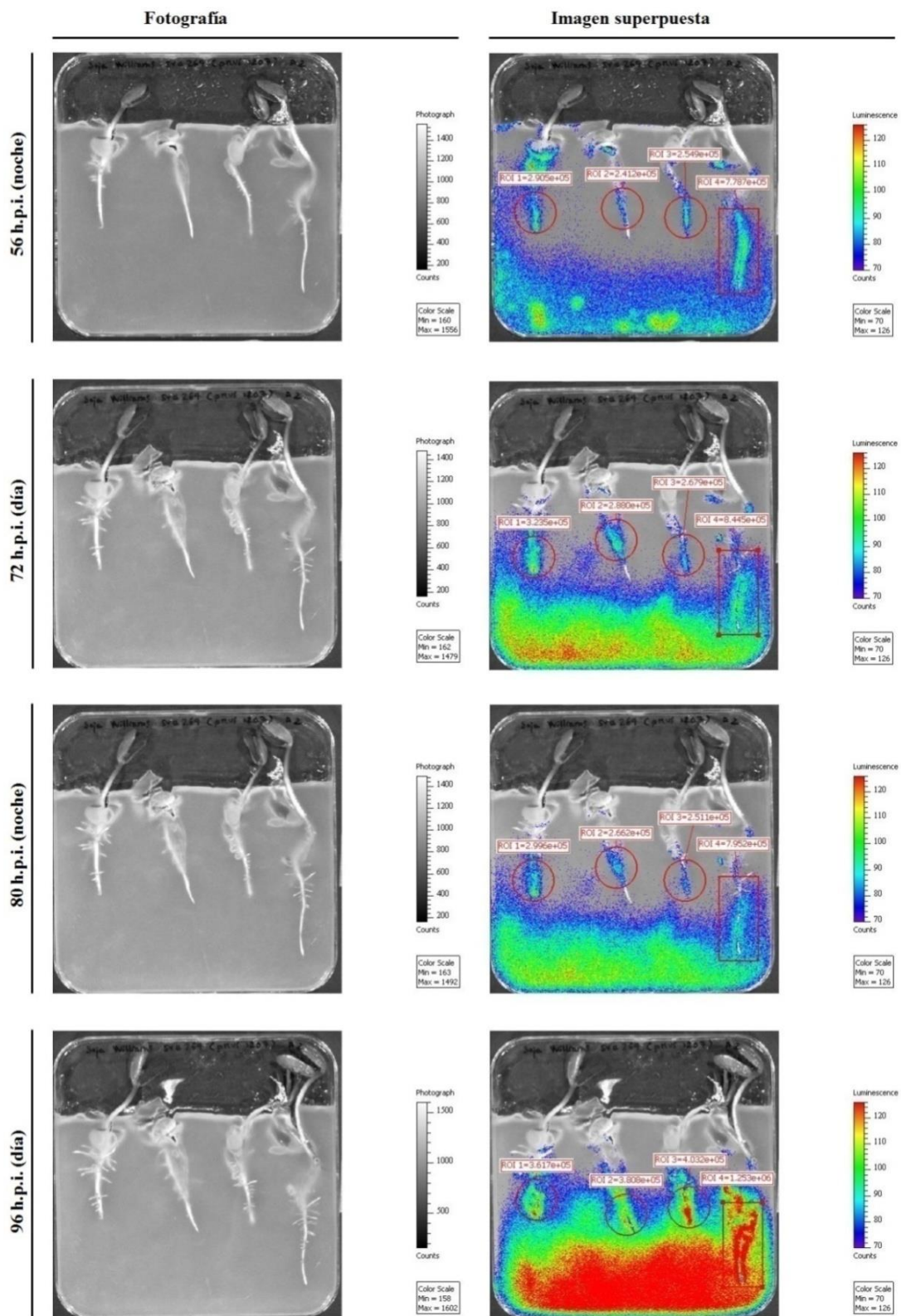


Figura 19. Determinación de la producción de luminiscencia por las estirpes HH103 (pMUS1199) (A), HH103 (pMUS1207) (B), HH103 *nodD1::lacZ-Gm^R* (pMUS1207) (C) y HH103 *ttsI::Ω* (pMUS1207) (D) en simbiosis con soja Williams.

Los resultados obtenidos mediante el uso del biosensor mostraron que la activación de la expresión de la fusión génica aumentó progresivamente durante el tiempo, aunque fluctuando, hasta llegar a su valor máximo alrededor de las 100 horas tras la inoculación (h.p.i.). El crecimiento bacteriano del biosensor puede ser una causa del aumento progresivo de los niveles de expresión del gen. Sin embargo, los resultados parecen evidenciar la existencia de dos picos de expresión a las 24 y 100 horas, correspondiéndose con dos puntos del fotoperiodo en el que las plantas se encontraban en oscuridad (**Figura 20, A y B**).

Por otro lado, los ensayos de nodulación realizados en vermiculita revelaron que los genes del T3SS continúan expresándose en los nódulos, aunque no en todos, a los 10, 14 y 18 d.p.i. (**Figura 21**). En base a estos resultados se realizaron los experimentos desarrollados en el **apartado 4. 6. del bloque II de Resultados**.





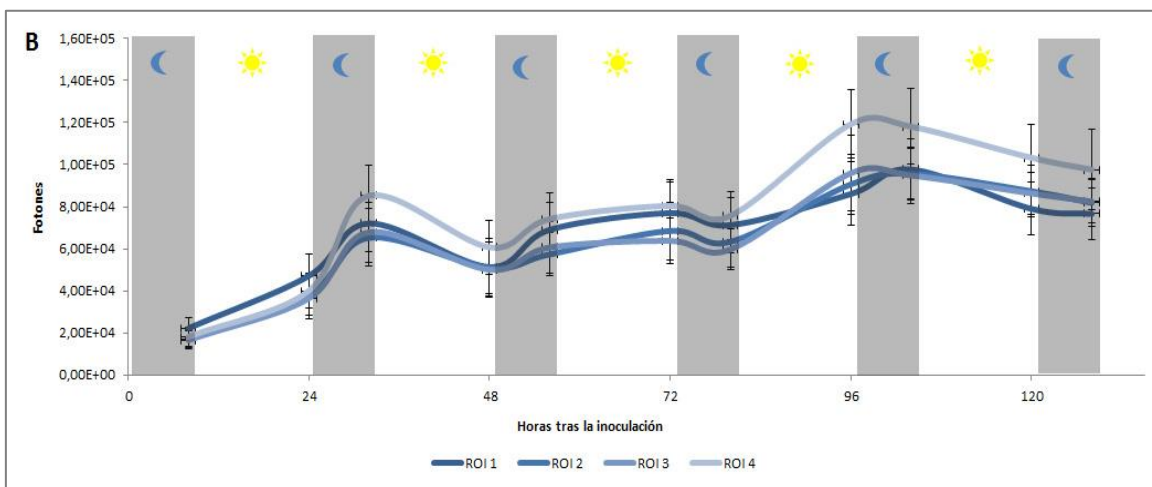
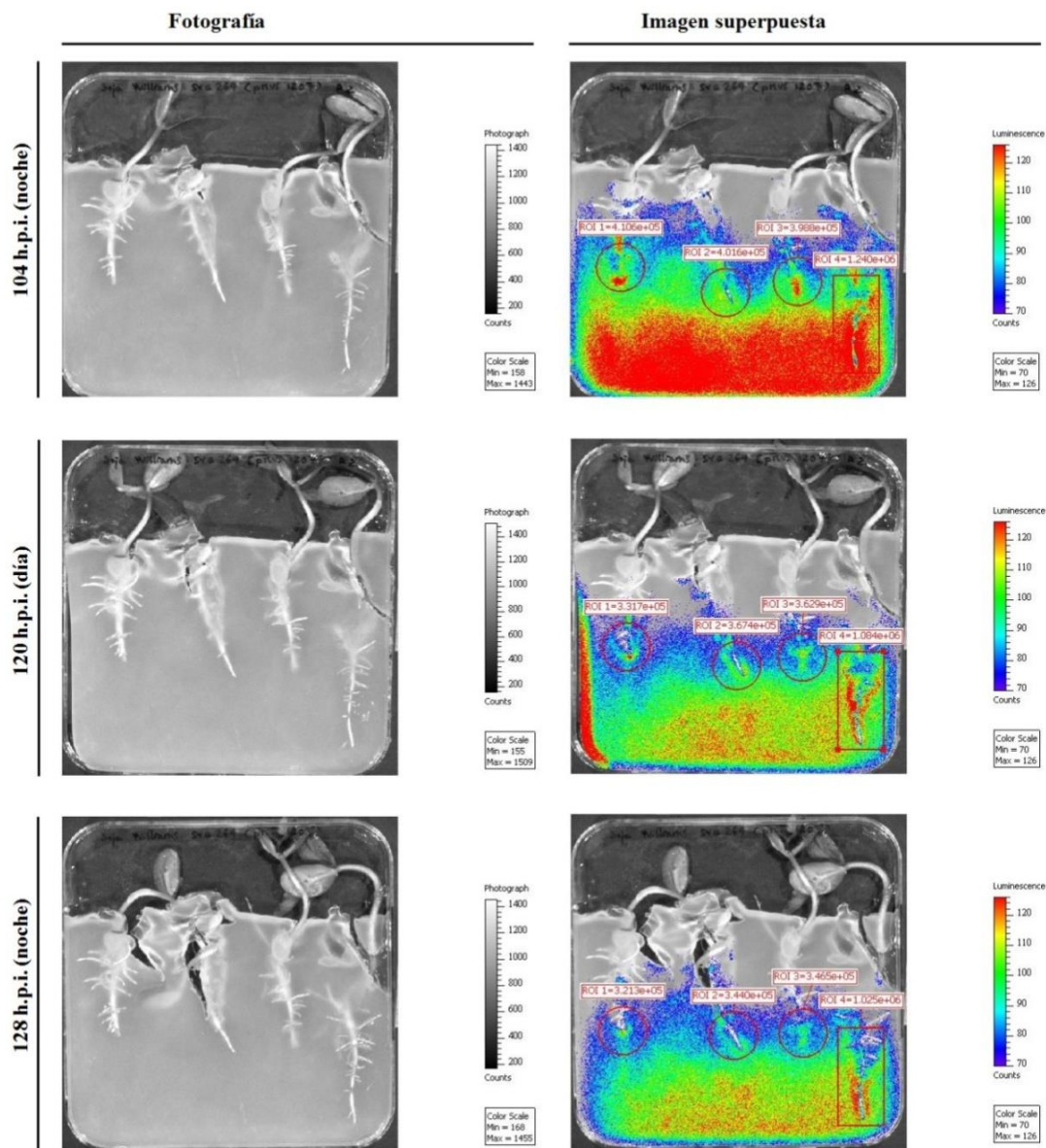


Figura 20. Medida de la expresión *in vivo* de genes regulados por la proteína TtsI mediante la producción de luminiscencia por el biosensor HH103 (pMUS1207) en la simbiosis con soja Williams. **A**, imágenes de raíces de soja inoculadas con el biosensor. **ROI 1**, plántula 1. **ROI 2**, plántula 2. **ROI 3**, plántula 3. **ROI 4**, plántula 4. **B**, cuantificación de los fotones en los puntos muestreados.

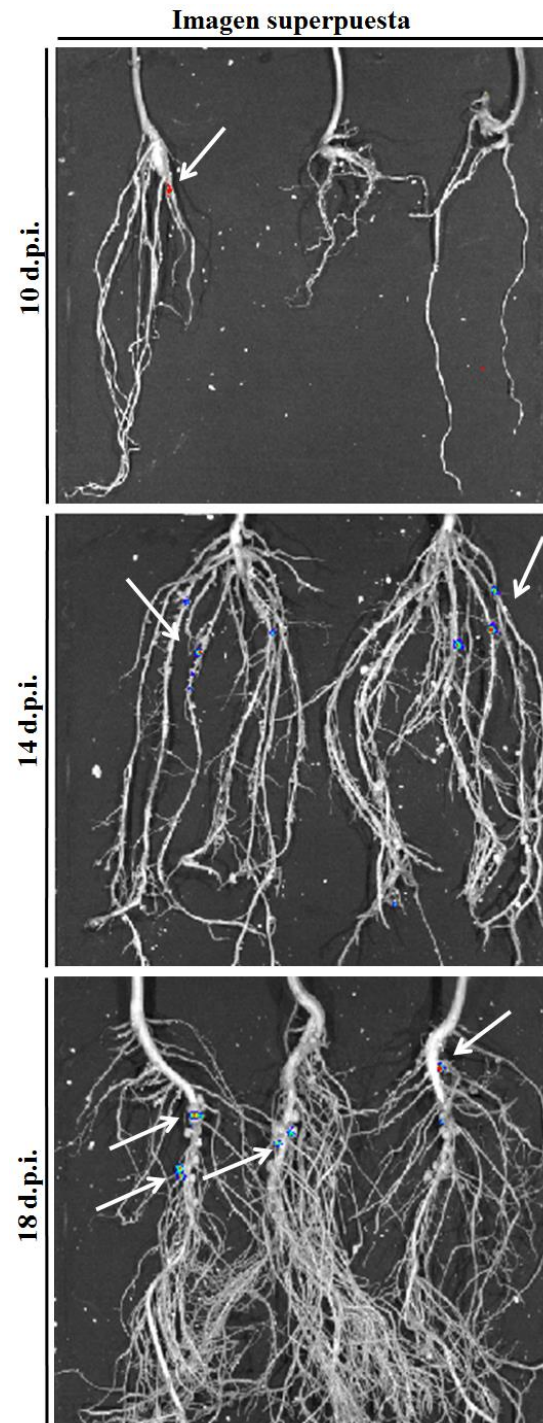


Figura 21. Medida de la expresión *in vivo* de genes regulados por la proteína TtsI mediante la producción de luminiscencia por el biosensor HH103 (pMUS1207) en los nódulos de soja Williams.

2. Moléculas de *S. fredii* HH103 inducen una respuesta de defensa primaria en soja Williams.

2. 1. La inoculación de la raíz de soja Williams con *S. fredii* HH103 induce la formación de depósitos de calosa.

Como se ha comentado en la introducción, el reconocimiento de las moléculas MAMP induce la producción de depósitos de calosa, entre otras respuestas. La calosa se suele acumular en el lugar de penetración del patógeno, posiblemente como barrera para prevenir su ataque (Aist y Bushnell, 1991; Millet *et al.*, 2010). La acumulación de calosa en las células epidérmicas de la raíz de soja se estudió para determinar si el conjunto de moléculas MAMP activan las respuestas de defensa en esta planta y, en ese caso, si el T3SS podía suprimir estas respuestas de defensa disparadas durante la MTI. Para estudiar esta acumulación de calosa, se inocularon las raíces de soja Williams con las estirpes HH103, HH103 *ttsI*:: Ω y HH103 *nodA*:: Ω (mutante incapaz de producir factores Nod), y se analizaron las raíces a los 2 d.p.i. mediante microscopía confocal.

Los resultados mostraron que no existía acumulación de calosa en las raíces sin inocular. Sin embargo, la estirpe parental, el mutante afectado en el T3SS y el mutante incapaz de producir factores Nod indujeron la acumulación de calosa en la zona de infección de la raíz, donde existe mayor abundancia de pelos radicales. No se encontraron diferencias significativas en el número de depósitos de calosa de las raíces de soja Williams inoculadas con las diferentes estirpes (**Figura 22, A y B**), lo que sugiere que el reconocimiento del rizobio por parte de la planta origina una respuesta de defensa primaria, inespecífica, independiente del T3SS y de los factores Nod.

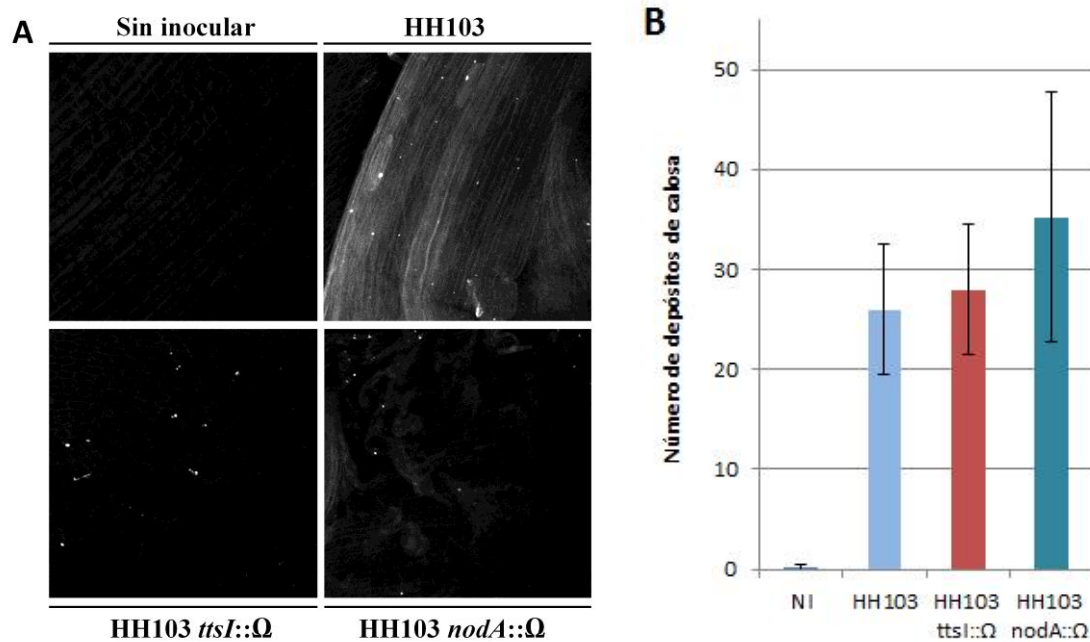


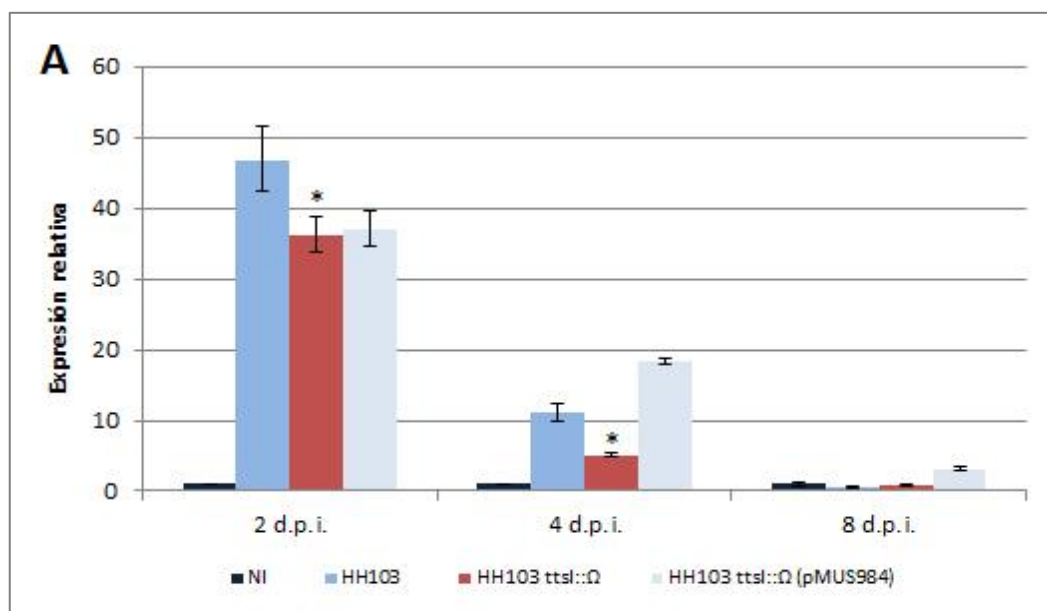
Figura 22. Depósitos de calosa en raíces de soja Williams inoculadas con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y HH103 *nodA::Ω*, a los 2 d.p.i. **A**, imágenes de los depósitos de calosa tomadas mediante microscopía confocal; **B**, cuantificación de los depósitos de calosa. Los datos representan la media de los depósitos de calosa de 10 imágenes tomadas al microscopio confocal.

2. 2. *S. fredii* HH103 induce la expresión de peroxidasas en la raíz de soja Williams.

La producción de ROS es un componente de señalización importante de un gran número de mecanismos celulares que incluye la activación de las respuestas de defensa como consecuencia del reconocimiento de un patógeno. De esta forma, se acumula rápidamente durante la HR en un proceso llamado estrés oxidativo y entre sus funciones se encuentran eliminar a los microorganismos, reforzar la pared celular e inducir los genes relacionados con la respuesta de defensa (Neill *et al.*, 2002; Apel y Hirt, 2004). En el caso de los simbiontes, la producción de ROS, especialmente el peróxido de hidrógeno, no solo tiene una función antimicrobiana, sino que también es necesaria para la organogénesis del nódulo. Esta dualidad puede dificultar la discriminación del aumento de ROS producto de una respuesta de defensa o debido al proceso de nodulación, en el caso de la relación simbiótica.

El estudio de la expresión mediante *qPCR* de dos peroxidasas de soja Williams involucradas en la respuesta de defensa, *Glyma14g05840* y *Glyma02g42730*, se realizó con el objeto de determinar si *S. fredii* HH103 activa la respuesta de defensa primaria en las raíces de soja y si el T3SS suprime esta respuesta defensiva inducida por las MAMP. Para ello se inocularon las raíces de soja Williams con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984) y se midió la expresión a los 2, 4 y 8 d.p.i..

Los resultados representados en la **Figura 23** mostraron una fuerte expresión de las peroxidasas a los 2 d.p.i. en todos los tratamientos ensayados. Además, la expresión disminuyó con el tiempo hasta llegar a alcanzar los valores del control sin inocular a los 8 d.p.i.. Sin embargo, tanto a los 2 como a los 4 d.p.i., los valores de expresión de ambas peroxidasas fueron significativamente mayores en las raíces de las plantas inoculadas con la estirpe parental HH103 respecto a las inoculadas con el mutante HH103 *ttsI::Ω*. Además, en la estirpe complementada HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984) se restauró el fenotipo presentado por la estirpe silvestre. Cabe destacar que los niveles de expresión de ambas peroxidasas coinciden con la expresión de los genes *NIN* y *ENOD40* (**Figuras 17 y 18**, respectivamente), en los que existe una mayor expresión de estos genes inducidos por la estirpe parental HH103 con respecto a los bajos niveles inducidos por la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* durante todo el proceso de infección.



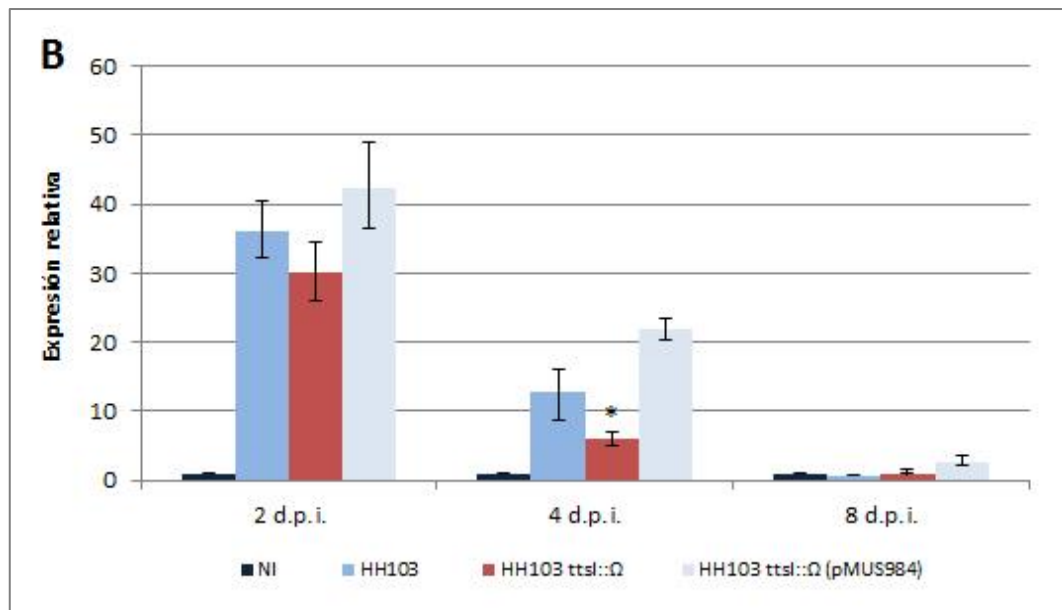
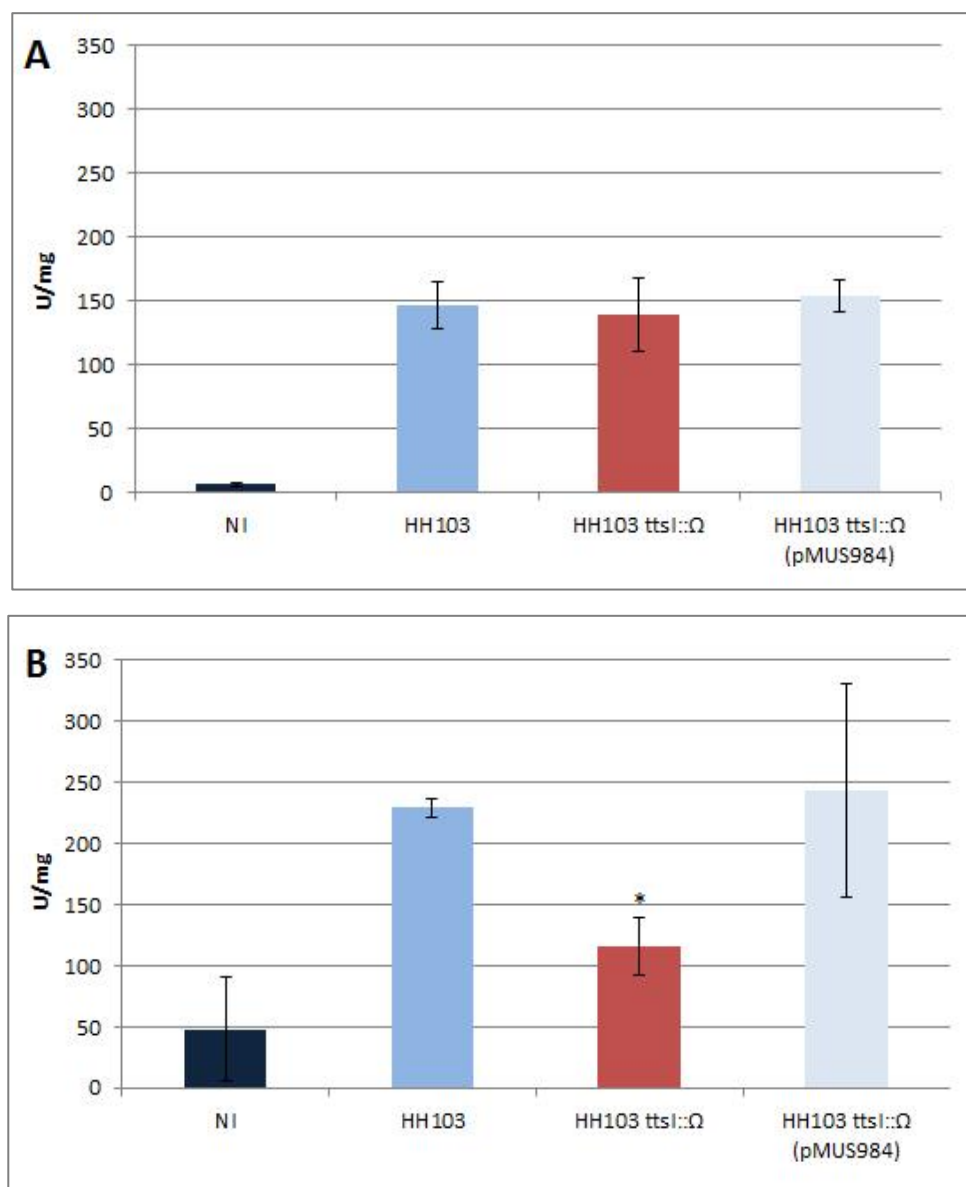


Figura 23. Cuantificación mediante *qPCR* de la expresión de genes que codifican enzimas peroxidasas en la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y su derivado complementado HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984). **A**, gen *Glyma14g05840*; **B**, gen *Glyma02g42730*. Los datos representan las medias de 3 réplicas de 2 extracciones de ARN independientes. Los valores del mutante HH103 *ttsI::Ω* se compararon individualmente con los de la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

Ya que los valores de expresión de las peroxidasas en las raíces de todos los tratamientos a los 8 d.p.i. fueron similares al control sin inocular, se decidió realizar la cuantificación de la actividad catalasa y de la superóxido dismutasa o SOD (del inglés, Superoxide Dismutase) a los 2 y 4 d.p.i., pero no a los 8 d.p.i. Además, se incluyó un nuevo punto de medición a las 2 h.p.i. para evitar la interferencia de la producción de ROS debido al proceso de nodulación y así poder determinar si el T3SS suprime la respuesta de defensa inducida por las moléculas superficiales de la bacteria. Sin embargo, se ha descrito que, inmediatamente tras la detección de los factores Nod por los receptores de las plantas hospedadoras, se da un pico de producción de ROS, por lo que resulta muy complejo determinar la función de estas moléculas.

La cuantificación de la actividad catalasa en las raíces inoculadas a las 2 h.p.i. reveló que no existen diferencias significativas entre las raíces inoculadas con la estirpe parental HH103 y el mutante HH103 *ttsI::Ω*, aunque sí se observó una mayor actividad en las raíces inoculadas respecto al control sin inocular. Sin embargo, las raíces de soja

Williams inoculadas tanto a los 2 como a los 4 d.p.i. presentaron un aumento significativamente mayor de la actividad en las plantas inoculadas con la estirpe parental HH103 con respecto a los valores inducidos por las plantas inoculadas con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* (**Figura 24, A, B y C**), coincidiendo con el perfil de expresión de las enzimas peroxidasas representado en la **Figura 23**. Los resultados obtenidos en la cuantificación de la actividad SOD no mostraron ninguna diferencia de la actividad en gel entre los tratamientos ensayados. Sin embargo, se observaron las isoformas de mayor tamaño a las 2 h.p.i. en las raíces de las plantas que fueron inoculadas (**Figura 24, D**).



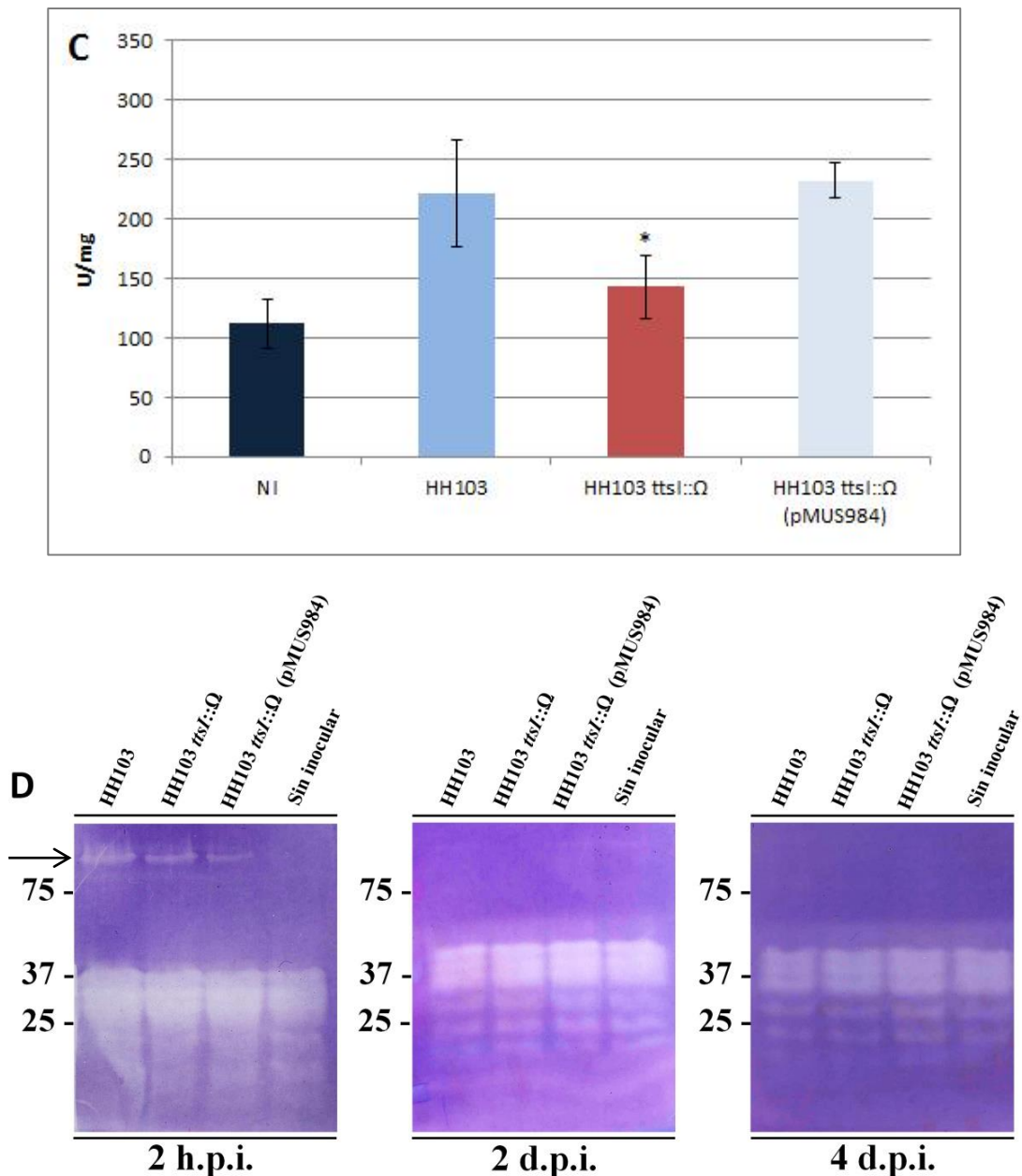


Figura 24. Cuantificación de las actividades enzimáticas catalasa y SOD (en gel) de la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984). **A**, actividad catalasa a las 2 h.p.i.; **B**, actividad catalasa a los 2 d.p.i.; **C**, actividad catalasa a los 4 d.p.i.; **D**, actividad SOD en gel. La flecha indica la isoforma de la SOD de mayor tamaño. Los datos relacionados con la actividad catalasa representan las medias de 3 réplicas de 2 extracciones independientes. Para la obtención de las imágenes relacionadas con la actividad SOD en gel se realizaron dos gels a partir de dos extracciones independientes. Para A, B y C, cada tratamiento se comparó individualmente con la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

El ácido malondihaldeído (MDA, del inglés, Malondihaldehyde Acid) es un indicador de la peroxidación de los lípidos de membrana, resultado del estrés oxidativo provocado por la acumulación de ROS. La cuantificación de MDA se realizó a los 4, 8 y 12 d.p.i., ya que su producción es detectada más tarde que las ROS. Como se puede observar en la **Figura 25** los mayores niveles de MDA se detectaron a los 8 d.p.i, siendo mayores los producidos en las raíces de soja Williams inoculadas con la estirpe parental HH103 con respecto a los valores inducidos por la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω*. En ambos casos, los niveles de MDA fueron significativamente superiores a los de las raíces sin inocular.

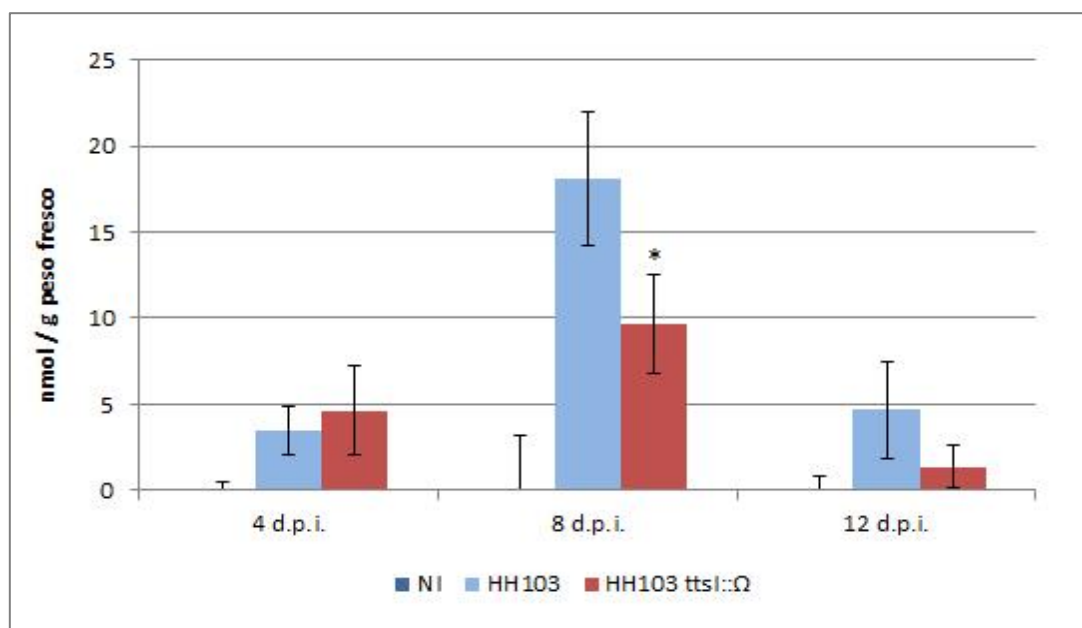


Figura 25. Cuantificación de MDA de la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103 y HH103 *ttsI::Ω*. Los datos representan las medias de 3 réplicas de 2 extracciones independientes. Los valores del mutante HH103 *ttsI::Ω* se compararon individualmente con los de la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

A partir de los resultados obtenidos en este apartado se pueden destacar las siguientes conclusiones:

Los resultados obtenidos mediante la cuantificación de los depósitos de calosa y las pruebas relacionadas con la producción de ROS, anterior al desarrollo visible de los nódulos, parecen indicar que *S. fredii* HH103 genera una respuesta de defensa primaria en soja Williams, inducida posiblemente por las moléculas de superficie de la bacteria.

Esta respuesta no depende del T3SS y no es lo suficientemente intensa como para bloquear el proceso de nodulación. Como se ha descrito anteriormente, la producción de ROS puede estar relacionada con la nodulación, promoviendo la formación y avance del tubo de infección en las células de la raíz de la leguminosa. De esta forma, pueden explicarse los resultados obtenidos en todas las medidas relacionadas con la cuantificación de las ROS. La expresión de las nodulinas tempranas, *NIN* y *ENOD*, y la producción de ROS en el intervalo de 2 a 8 d.p.i. se correlacionan positivamente e indican que se produce una mayor nodulación en las plantas de soja Williams inoculadas con la estirpe parental HH103 con respecto a las inoculadas con la estirpe mutante HH103 *tttI::Ω*.

Por lo tanto, en la relación simbiótica HH103-soja Williams se constata la dualidad de la producción de ROS, actuando al mismo tiempo como parte de un mecanismo de defensa de la planta y como un agente implicado en la promoción de la nodulación.

2. La respuesta de defensa inducida por *S. fredii* HH103 en soja Williams está mediada por la producción de SA y es suprimida por el T3SS.

2. 1. El T3SS de *S. fredii* HH103 modula el balance hormonal de SA durante la simbiosis con soja Williams.

Muchos organismos fitopatógenos utilizan el T3SS para alterar el balance hormonal en su propio beneficio (**Grant y Jones, 2009**). Para determinar si *S. fredii* HH103 también modula la producción de hormonas durante la simbiosis con soja Williams se cuantificaron algunas hormonas relacionadas con la defensa, como son el SA, el ABA, el ET y el JA. Se comenzó con el estudio de la producción del SA, ya que esta hormona está considerada como una molécula clave en la resistencia a la enfermedad en plantas y, aunque no se conocen con exactitud los mecanismos en los que está involucrada, sí se sabe que se encuentra íntimamente ligada con la inducción de la HR y la SAR (**Durner et al., 1997; Feys y Parker, 2000**).

El trabajo de **Huang et al. (2006)** describe la utilización del biosensor *Acinetobacter* sp. ADP1_ *lux* para cuantificar *in vivo* la concentración de SA en hojas de tabaco, siendo una metodología rápida, eficaz y de bajo coste. Por este motivo, se decidió determinar la

concentración de SA en las raíces de soja Williams a los 2, 4 y 8 d.p.i. con las estirpes HH103 y HH103 *ttsI::Ω* mediante la utilización de este biosensor. Los resultados mostraron un aumento significativo de la concentración de SA en las raíces de las plantas inoculadas con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* en todos los puntos analizados, incluso en las hojas de las plantas a los 8 d.p.i. (**Figura 26, A y B**). Además, los valores que presentó la estirpe parental fueron similares a los del control sin inocular.

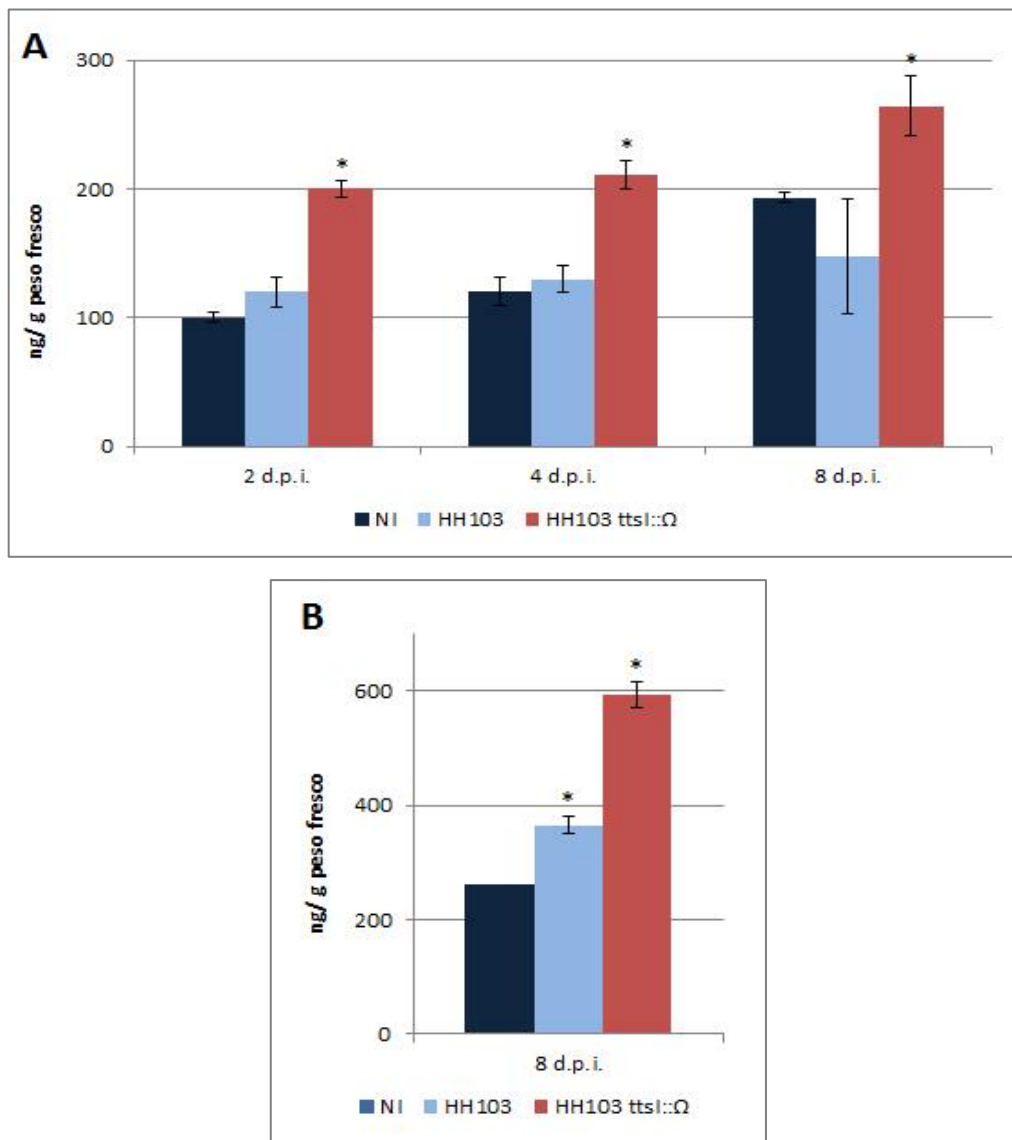


Figura 26. Cuantificación de SA mediante el biosensor bioluminiscente *Acinetobacter* sp. ADP1_ *lux* de la raíz (**A**) y de la hoja (**B**) de soja Williams inoculada con las estirpes HH103 y HH103 *ttsI::Ω*. Los datos representan las medias de 3 réplicas de 2 extracciones independientes. Los valores correspondientes a la estirpe parental HH103 y a la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* se compararon individualmente con el control sin inocular usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

Con el objetivo de validar los resultados obtenidos con el biosensor se cuantificó la concentración de SA mediante HPLC. En este caso se incluyó un nuevo punto de medida a las 2 h.p.i. para estudiar la respuesta de defensa más inmediata inducida por la presencia *S. fredii* HH103 en las raíces de soja Williams. Los resultados mostraron el mismo patrón en la concentración de SA en todos los puntos comunes analizados por ambos procedimientos, siendo significativamente mayores los valores obtenidos mediante la inoculación de las raíces con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* respecto a la parental HH103.

A las 2 h.p.i. los resultados revelaron una tendencia al aumento en la concentración de SA de las raíces inoculadas con la estirpe parental HH103 respecto a las inoculadas con el mutante HH103 *ttsI::Ω*. Esto parece indicar que el reconocimiento de una o más moléculas dependientes de TtsI podría/n activar muy rápidamente la respuesta de defensa de la planta. Sin embargo, deben existir otras moléculas de la superficie bacteriana independientes del T3SS que son reconocidas específicamente por la planta, ya que como se ha comentado con anterioridad, en el resto de los puntos muestreados las plantas inoculadas con el mutante HH103 *ttsI::Ω* sufren un incremento significativo de los niveles de esta hormona respecto a las inoculadas con la estirpe parental HH103.

Las plantas sin inocular y las inoculadas con la estirpe parental HH103 experimentaron una disminución en la concentración de SA a lo largo del tiempo, decayendo hasta 5 veces a los 8 d.p.i. en ambos casos. Sin embargo, la concentración de SA de las raíces de soja Williams inoculadas con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* presentó valores similares en todos los puntos muestreados, siendo significativamente superiores a los de la estirpe silvestre HH103 desde los 2 a los 8 d.p.i. (**Figura 27**). La complementación de la mutación no restableció todos los valores de concentración respecto a los obtenidos por la inoculación de la estirpe silvestre HH103. Como se comentó anteriormente, para la complementación de la mutación se utilizó el plásmido pMP92 por lo que no es posible controlar ni la dosis génica ni la estabilidad del plásmido durante el proceso simbiótico.

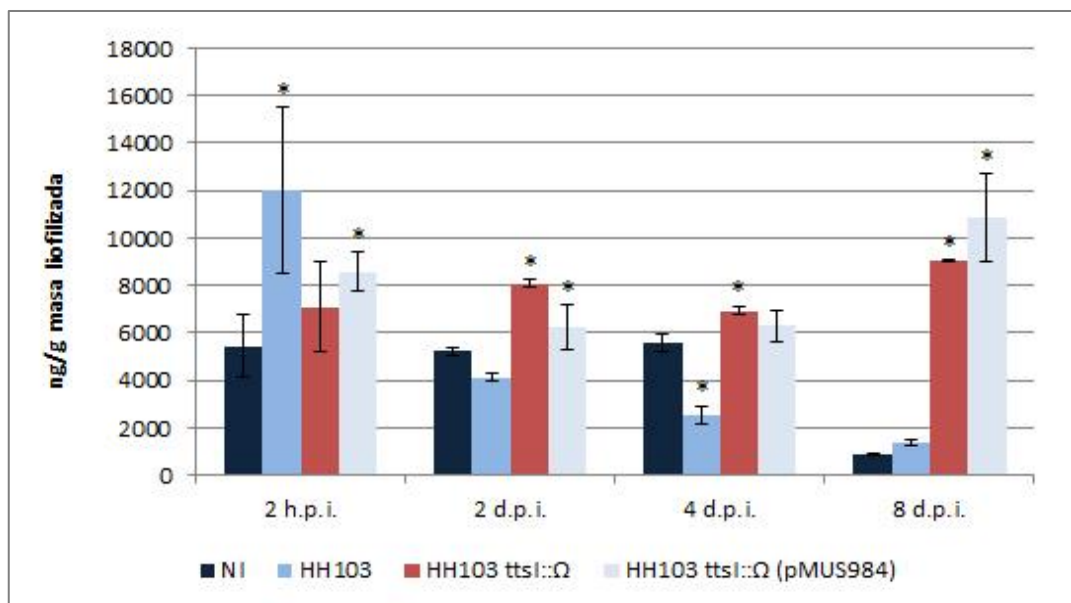


Figura 27. Cuantificación de SA mediante HPLC de la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y su derivado complementado HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984). Los datos representan la media de 2 réplicas de 2 extracciones independientes. Cada tratamiento se comparó individualmente con el control sin inocular usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

En concordancia con el estudio del balance hormonal en la simbiosis de *S. fredii* HH103 con la soja Williams se decidió realizar la cuantificación del JA-isoleucina (JA-ile) (forma activa del JA en la planta). Esta hormona junto con el SA se consideran señales antagonistas en la respuesta de defensa (Glazebrook, 2005), aunque existen estudios sobre la interacción sinérgica entre ambas (Beckers y Spoel, 2005). La concentración del JA-ile se midió mediante HPLC en las raíces de soja Williams inoculadas a las 2 h.p.i. y 2, 4, y 8 d.p.i. con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y la estirpe complementada HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984).

Los resultados obtenidos sobre la cuantificación de JA-ile, mostrados en la **Figura 28**, indicaron la existencia de un pico de producción de JA-ile en aquellas raíces de soja Williams inoculadas con la estirpe parental HH103 a los 8 d.p.i., mientras que los valores de concentración de esta hormona en las raíces control y las inoculadas con el mutante HH103 *ttsI::Ω* se mantuvieron muy bajos en este punto. Por otro lado, no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos a las 2 h.p.i. y a los 2 d.p.i., mientras que a los 4 d.p.i. se observó un leve incremento, aunque significativo, en la

producción de esta hormona en las raíces inoculadas con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω*. La complementación de la mutación restableció en gran medida los valores de la estirpe mutante llegando a ser similares a los observados en el tratamiento con la estirpe silvestre HH103.

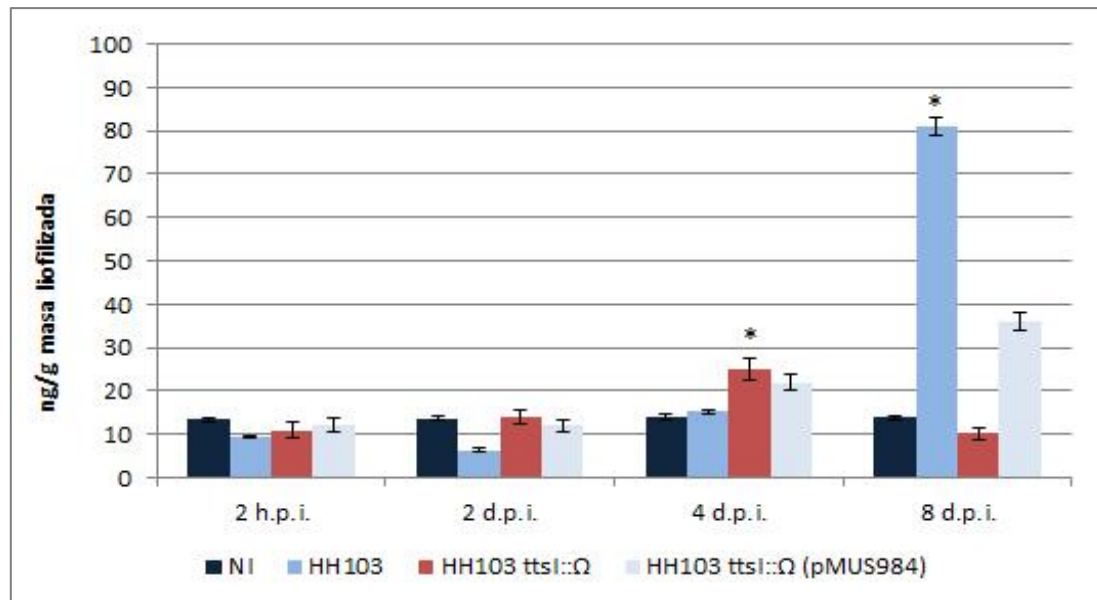


Figura 28. Cuantificación JA-ile mediante HPLC de la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y de su derivado complementado HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984). Los datos representan la media de 2 réplicas de 2 extracciones independientes. Cada tratamiento se comparó individualmente con el control sin inocular usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

Al ABA siempre se le ha atribuido un papel principal en el estrés abiótico, pero en los últimos años también se ha estudiado su implicación en la defensa (Asselbergh *et al.*, 2008; Mauch-Mani y Mauch, 2005). Por ello, se cuantificó la concentración de ABA de las raíces de soja Williams mediante HPLC utilizando los mismos tratamientos que se han descrito anteriormente para el SA o el JA-ile. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias claras entre los distintos tratamientos, con la excepción de la concentración de esta hormona en las raíces de soja Williams inoculadas con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* a las 2 h.p.i. y a los 2 d.p.i.. En este caso los valores fueron ligeramente mayores a los obtenidos en las raíces inoculadas con la estirpe parental HH103, aunque éstos fueron significativamente diferentes respecto a las raíces control sin inocular. Además, los niveles más altos de esta hormona se detectaron a las 2 h.p.i. y

a los 2 d.p.i. y, posteriormente, sufrieron un fuerte descenso a los 4 d.p.i., llegando a los mínimos valores de concentración a los 8 d.p.i. (**Figura 29**).

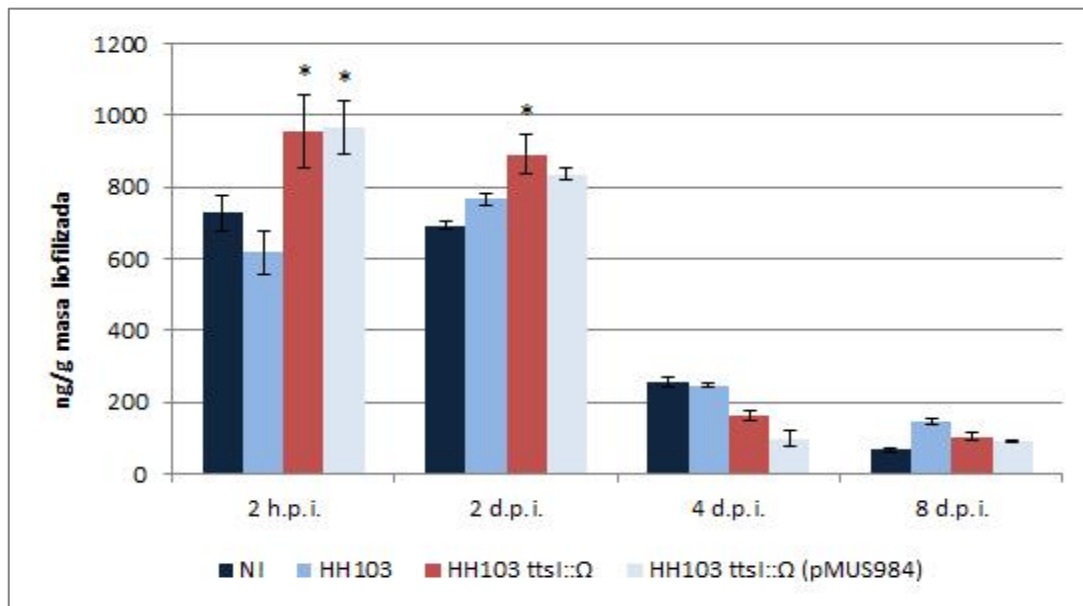


Figura 29. Cuantificación de ABA mediante HPLC de la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y su derivado complementado HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984). Los datos representan la media de 2 réplicas de 2 extracciones independientes. Cada tratamiento se comparó individualmente con el control sin inocular usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

De forma general se ha determinado que el ET se correlaciona positivamente con el JA en la activación de la defensa contra patógenos necrotróficos, es decir, aquellos que matan a las células y luego extraen sus nutrientes, y se considera antagonista al SA en la resistencia contra los patógenos biotróficos, que parasitan introduciéndose dentro de los tejidos vegetales de la planta manteniéndolos vivos (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002; Diaz *et al.*, 2002; Knoester *et al.*, 1998; Lorenzo y Solano, 2005; Rojo *et al.*, 2003; Thomma *et al.*, 1998, 1999). Sin embargo, diversos trabajos han mostrado excepciones de esta aceptación sobre el papel del ET en la defensa. Para determinar la implicación del ET en la simbiosis de *S. fredii* HH103 con soja Williams se cuantificó la concentración de esta hormona producida durante las primeras 24 horas mediante cromatografía de gases en las plántulas de soja Williams inoculadas con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y la estirpe complementada HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984). La metodología utilizada, que implica la medida de un gas como el ET, impidió cuantificar

su concentración más allá de 1 d.p.i., por lo que no fue posible tomar más puntos para determinar si su concentración cambiaba con el tiempo. La **Figura 30** muestra un aumento significativo de la producción de ET de las plantas inoculadas con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y la estirpe complementada HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984) con respecto a los valores de las plantas control sin inocular. Además, se dio un incremento de la concentración de ET en las plantas inoculadas con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* respecto a los valores obtenidos en las plantas inoculadas con la estirpe parental HH103, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

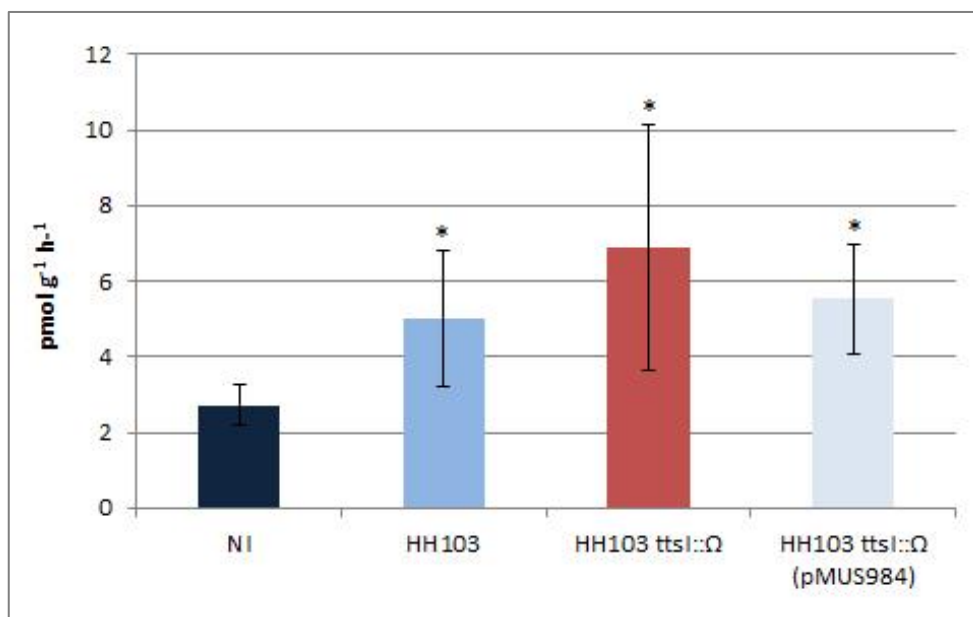


Figura 30. Cuantificación de ET mediante cromatografía de gases de la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y su derivado complementado HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984). Los datos representan la media de dos plantas con 7 réplicas independientes. Cada tratamiento se comparó individualmente con el control sin inocular usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

2.2. El incremento de los niveles de SA producido en respuesta al mutante HH103 *ttsI::Ω* induce la expresión del gen *GmPRI* de la soja Williams.

El gen *GmPRI* se considera como un marcador de la SAR, siendo necesario altos niveles de SA producidos en la respuesta de defensa para la transcripción de este gen. Teniendo en cuenta los resultados anteriormente descritos en el **apartado 2.1. del bloque I de Resultados** sobre el aumento de la producción de SA en la raíz de soja

Williams en respuesta a la estirpe parental HH103 y, en mayor medida, al mutante HH103 *ttsI::Ω*, y para confirmar que este aumento se correlaciona con la expresión del gen *GmPRI*, se cuantificó la expresión de *PRI* mediante *qPCR*. Para ello, se inocularon plantas de soja Williams con la estirpe silvestre HH103, el mutante HH103 *ttsI::Ω* y su derivado complementado HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984) y se procesaron a los 2, 4 y 8 d.p.i.

Los resultados mostraron que el mayor nivel de expresión del gen *GmPRI* de las plantas inoculadas con la estirpe parental HH103 se daba a los 2 d.p.i. (alrededor de 6 veces), reduciéndose la expresión a un 50% a los 4 d.p.i. y a aún más a los 8 d.p.i., hasta alcanzar los niveles de expresión de las plantas sin inocular. Sin embargo, el mayor pico de expresión del gen *GmPRI* en las raíces de plantas inoculadas con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* se detectó a los 4 d.p.i. (alrededor de 7 veces), decayendo levemente con el tiempo. Además, en este punto, a los 4 d.p.i. fue cuando se observaron las mayores diferencias de expresión con respecto a las plantas sin inocular (**Figura 31**). La complementación de la mutación restauró parcialmente los niveles de expresión del gen observados en plantas inoculadas con la estirpe parental.

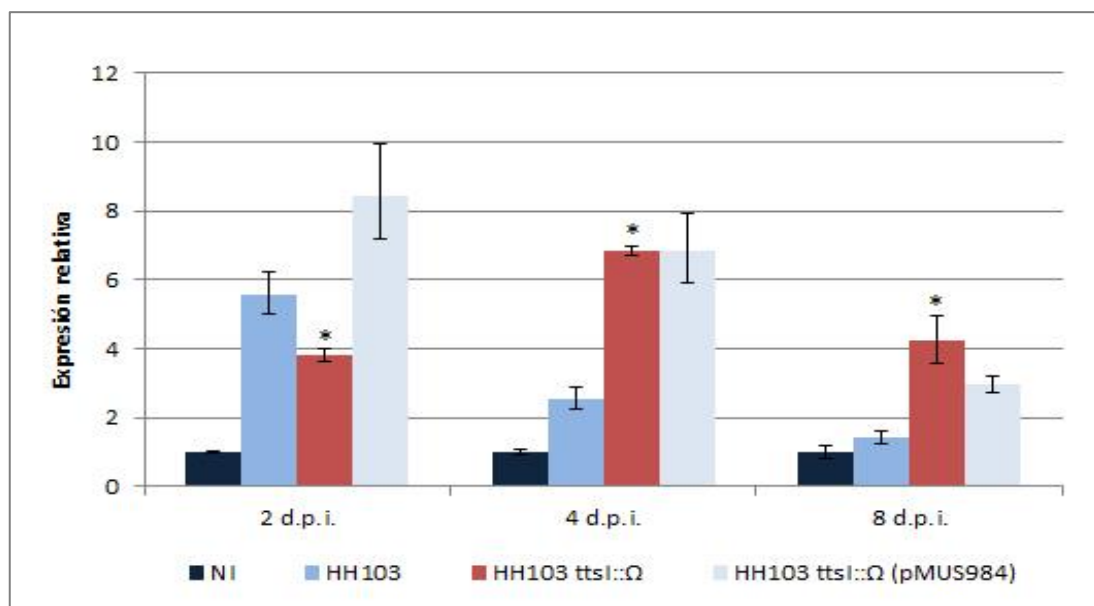


Figura 31. Cuantificación mediante *qPCR* de la expresión del gen *GmPRI* en la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y su derivado complementado HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984). Los datos representan la media de 3 réplicas de 2 extracciones de ARN independientes. Los valores de la estirpe mutante se compararon individualmente con los de la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

Es conocido que la expresión del gen *GmPR2* depende de ET (Mazarei *et al.*, 2007). Sin embargo, algunos estudios indican que la expresión de este gen se inhibe por la inoculación con rizobios (Godiard *et al.*, 2007; Mitra y Long, 2004) y que esto puede ser debido a la supresión de la respuesta de defensa, posiblemente modificando los niveles de SA (Ding y Oldroyd, 2009). La expresión del gen *GmPR2* se midió con el fin de estudiar si este gen se encuentra implicado en la defensa mediada por SA y verificar la implicación del T3SS en esta respuesta. Para ello, al igual que en el caso anterior, se cuantificó su expresión mediante *qPCR* en la raíz de soja Williams inoculada con la estirpe HH103, HH103 *ttsI::Ω* y su derivado complementado HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984) a los 2, 4 y 8 d.p.i..

Los resultados presentados en la **Figura 32** muestran un aumento leve, aunque significativo, en la expresión del gen *GmPR2* a los 2 d.p.i. en las raíces de las plantas inoculadas con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* (dos veces) respecto a las plantas inoculadas con la estirpe parental HH103. Además, los niveles inducidos por la estirpe silvestre fueron similares a los de las plantas sin inocular. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a los 4 y 8 d.p.i., siendo los niveles muy bajos (datos no mostrados). La activación del gen *GmPR2* en las raíces de las plantas inoculadas con el mutante HH103 *ttsI::Ω* podría explicarse por el ligero aumento en la concentración de ET o por los altos niveles de SA inducido por este mutante a 1 d.p.i. y a los 2 d.p.i., respectivamente. Los resultados sobre la expresión de los dos genes *PR* parecen constatar que el T3SS está implicado en la atenuación de la respuesta de defensa que se produce en la planta por el reconocimiento del rizobio.

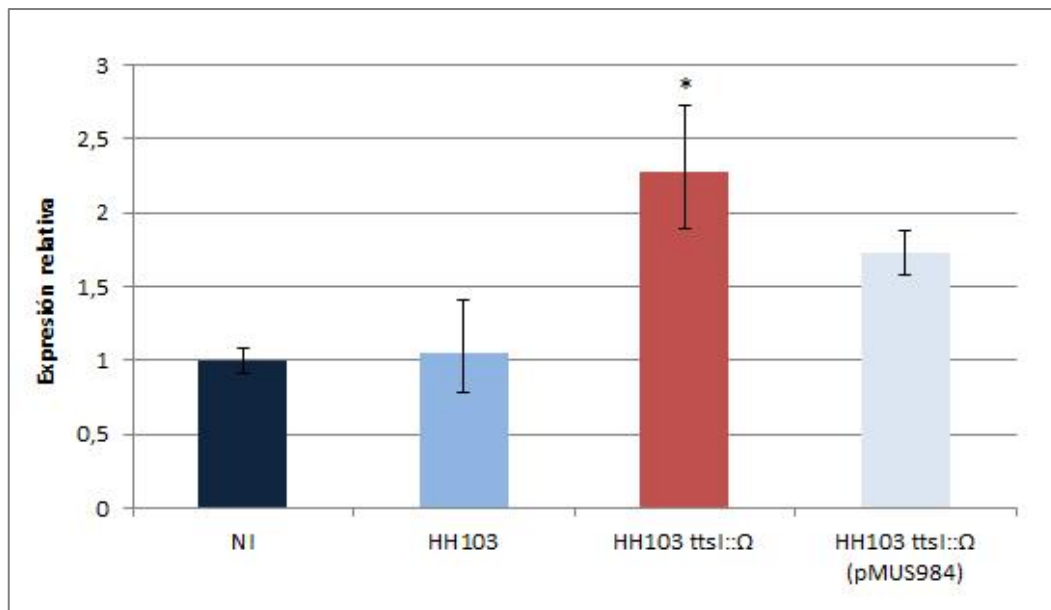


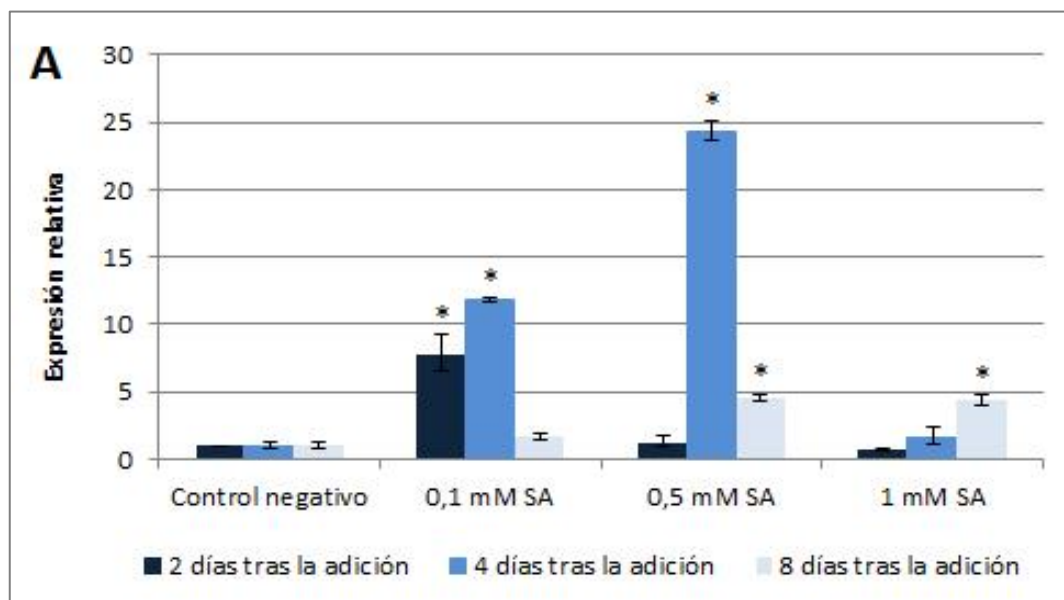
Figura 32. Cuantificación mediante *qPCR* de la expresión del gen *GmPR2* en la raíz de plantas de soja Williams inoculada con la estirpesilvestre HH103, el mutante HH103 *ttsI::Ω* y su derivado complementado HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984) a los 2 d.p.i.. Los datos representan la media de 3 réplicas de 2 extracciones de ARN independientes. Los valores de la estirpe mutante se compararon individualmente con los de la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

2. 3. El SA exógeno induce la expresión de los genes *GmPR1* y *GmPR2* y causa una reducción del número de nódulos en la simbiosis de *S. fredii* HH103 con la soja Williams.

Una vez confirmado que la soja Williams reaccionaba ante la presencia de *S. fredii* HH103 mediante la producción de SA y la expresión de los genes *PR*, se decidió tratar las plantas con SA de forma exógena para conseguir efectos similares a los descritos anteriormente y poder así verificar estos resultados. En primer lugar, para determinar la máxima concentración de SA que no afectase de forma severa al desarrollo de las plantas de soja Williams, se ensayaron diferentes concentraciones de esta hormona (0,1, 0,5 y 1 mM) en un sistema de hidroponía estéril en vasos de precipitado. Además, se estudió la expresión de los genes *GmPR1* y *GmPR2* a los 2, 4 y 8 días tras la adición del SA (d.p.a.). Los resultados mostraron que la concentración de 1 mM de SA afectó negativamente al crecimiento de las plantas de soja Williams, provocando necrosis en la parte aérea y una inhibición del crecimiento de la raíz (datos no mostrados). Esto podría explicar los resultados obtenidos sobre la expresión de *GmPR1* y *GmPR2* cuando se

utilizó 1 mM de SA, en los que sus niveles de expresión fueron mínimos y los perfiles de expresión muy similares en todos los tiempos de tratamiento (**Figura 33**).

La adición de SA a las raíces de soja Williams a una concentración de 0,5 mM no alteró severamente el desarrollo de la planta (datos no mostrados). Sin embargo, se obtuvo el mayor pico de expresión de los genes *GmPR1* (24 veces) y *GmPR2* (3,5 veces) a los 4 d.p.a., siendo el perfil de expresión de ambos genes muy similar. No se observaron efectos negativos a una concentración 0,1 mM de SA (datos no mostrados). A esta concentración se detectó la activación de la transcripción de los genes *GmPR1* y *GmPR2* en las raíces de soja Williams, siendo significativamente mayor la activación del gen *GmPR1* a los 4 d.p.a. y sin diferencias significativas entre los puntos muestreados respecto a la expresión del gen *GmPR2*. Cabe destacar que los perfiles de expresión de ambos genes *PR* fueron muy similares y que el SA a bajas concentraciones provocó la inducción de su expresión antes (2 d.p.a. a 0,1 mM) que a concentraciones más elevadas (4 d.p.a. a 0,5 mM y 8 d.p.a. a 1 mM). Posiblemente, esto pueda deberse a que al aumentar la concentración de SA se activen multitud de genes destinados a la supervivencia de la planta y que ésta tarde más tiempo en responder a otros estímulos secundarios.



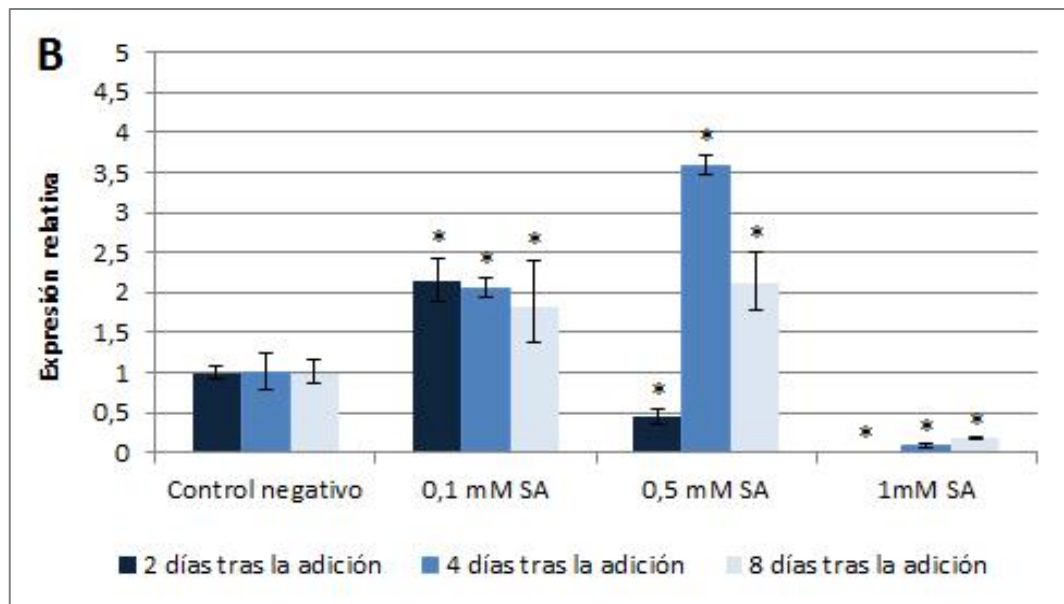


Figura 33. Cuantificación mediante *qPCR* de la expresión de los genes *GmPR1* (A) y *GmPR2* (B) en la raíz de soja Williams tratada con SA a 1, 0,5 y 0,1 mM. Los datos representan la media de 3 réplicas de 2 extracciones de ARN independientes. Cada tratamiento se comparó individualmente con el control sin SA usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

Con el fin de estudiar el efecto del SA exógeno en la nodulación, se realizaron ensayos en jarros Leonard con plantas de soja Williams inoculadas con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y su derivado complementado HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984). Para analizar la supervivencia de las estirpes ensayadas al SA se realizó un recuento del número de células viables en el sistema de hidroponía en vasos de precipitado con soja Williams y 0,5 mM de SA (Figura 34).

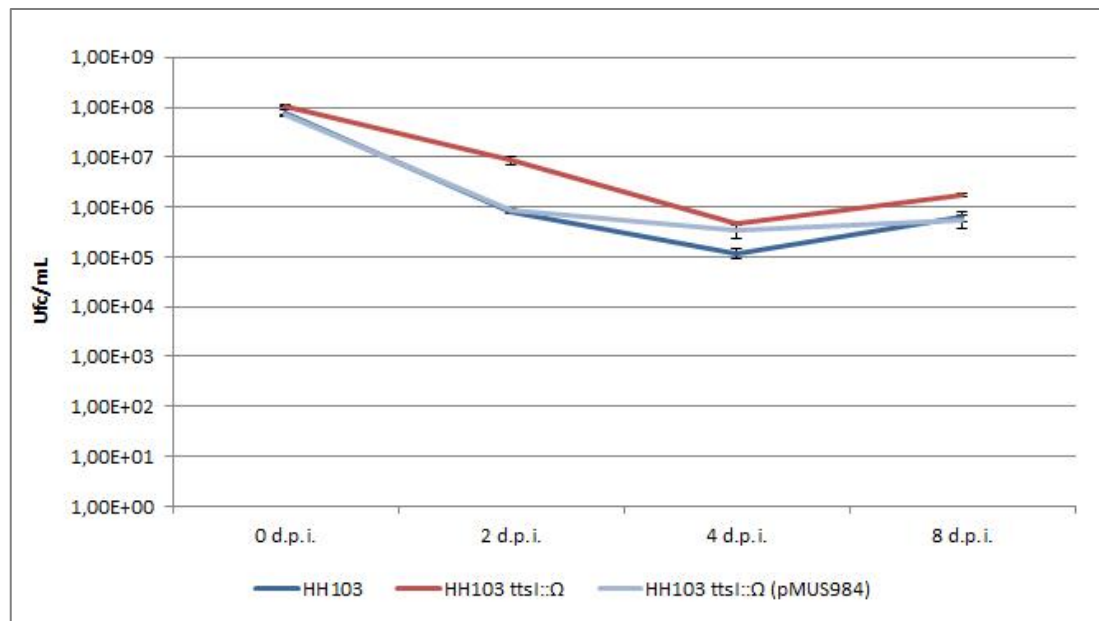


Figura 34. Recuento del número de células viables en el sistema de hidroponía en vasos de precipitado con soja Williams y 0,5 mM de SA. Se inocularon las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984).

Aunque los resultados observados en la **Figura 34** muestran que la concentración idónea para los ensayos con SA exógeno parece ser 0,5 mM, el ensayo de nodulación se realizó a una concentración de 1 mM de SA en el depósito mezclado con la solución Fåhraeus. La principal razón por la que se escogió esta concentración fue que en este sistema la raíz de la planta durante los primeros días de crecimiento no se encuentra en contacto directo con el SA, a diferencia de lo que ocurre con el sistema de hidroponía en vasos de precipitado, por lo que facilita la observación de los efectos producidos por la hormona.

Los resultados de la **Tabla 13 y la Figura 35 (A y B)** muestran que el SA a una concentración de 1 mM provocó una reducción significativa del número de nódulos en todos los tratamientos ensayados en comparación con aquellos en los que no se les añadió la hormona. Incluso se observó que el número de nódulos formados en las plantas tratadas con SA fue muy similar (alrededor de 15 nódulos), independientemente de la estirpe inoculada.

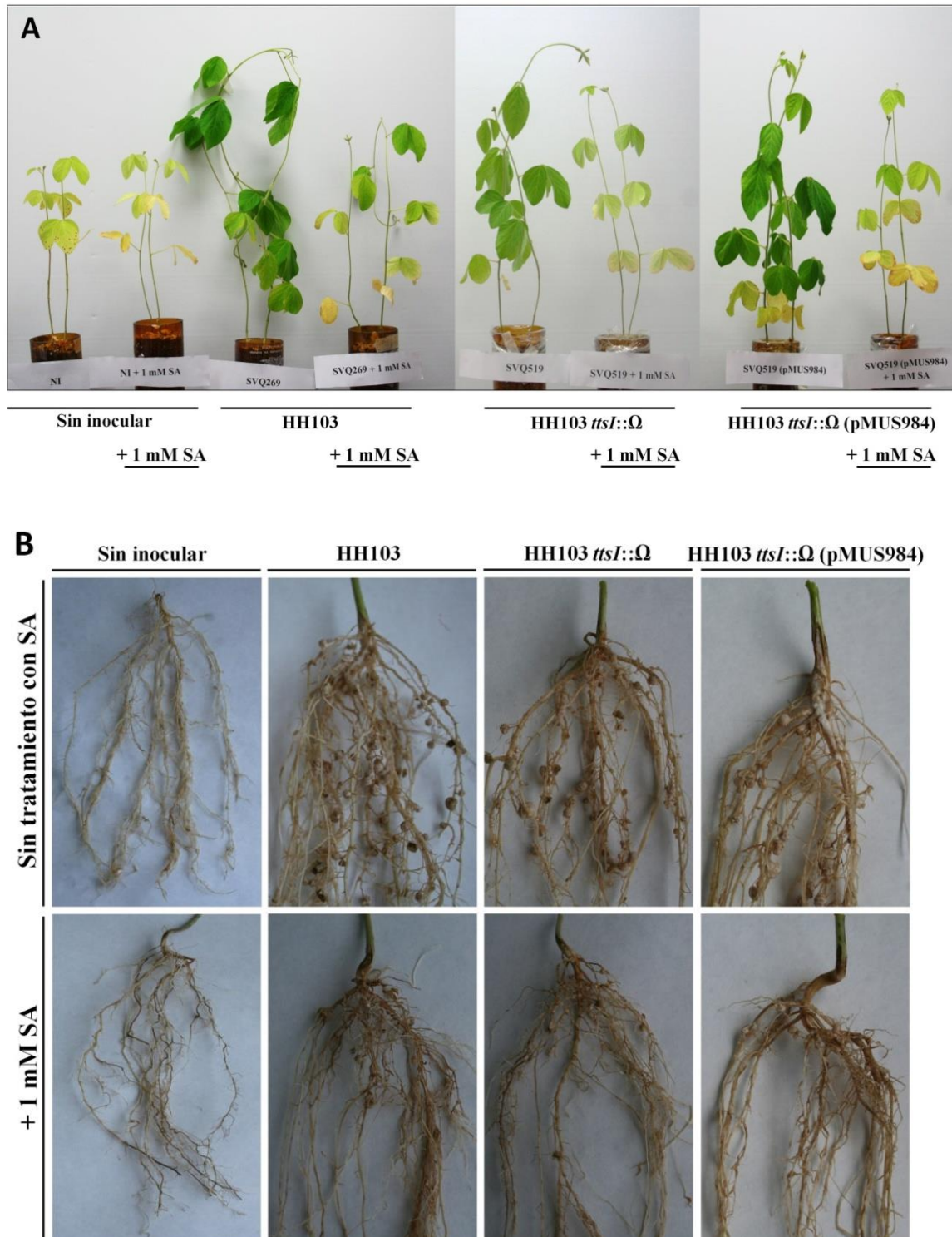


Figura 35. Fenotipo simbiótico de las plantas de soja Williams inoculadas con la estirpe parental HH103, el mutante HH103 *ttsI::Ω* y su derivado complementado HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984) en ausencia o presencia de 1 mM de SA. **A**, aspecto de la parte aérea de la planta; **B**, aspecto de las raíces.

Tabla 13. Respuesta de soja Williams al SA exógeno y a la inoculación con la estirpe parental HH103, el mutante HH103 *ttsI::Ω* y su derivado complementado HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984).

Inoculante	Número de nódulos	Masa fresca de nódulos (g)	Masa seca de la parte aérea (g)
Sin inocular	0	0	• ±
Sin inocular + 1 mM SA	0	0	• ±
HH103	• 71,9 ± 20,9	1,08 ± 0,2	• 1,978 ± 0,511
HH103 + 1 mM SA	• 16,1 ± 9,5*	• 0,51 ± 0,31	• 1,49 ± 0,41
HH103 <i>ttsI::Ω</i>	• 34,4 ± 10,8*	• 0,72 ± 0,23	• 1,353 ± 0,39
HH103 <i>ttsI::Ω</i> + 1 mM SA	• 15,9 ± 4,35*	• 0,24 ± 0,1*	• 0,869 ± 0,177*
HH103 <i>ttsI::Ω</i> (pMUS984)	• 51 ± 9,8	• 0,808 ± 0,175	• 1,553 ± 0,459
HH103 <i>ttsI::Ω</i> (pMUS984) +1 mM SA	• 16,2 ± 5,6*	• 0,286 ± 0,183*	• 1,051 ± 0,407

Los datos representan la media de 12 plantas. Los valores se tomaron 6 semanas después de la inoculación o tratamiento. Las bacterias aisladas de 20 nódulos formados por cada inoculante mostraron los marcadores de resistencia esperados. Cada tratamiento se comparó individualmente con la estirpe parental sin tratar usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los números de la misma columna seguidos de un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

2. 4. El T3SS de *S. fredii* HH103 evita una posible respuesta sistémica en la planta.

Los resultados descritos hasta ahora indican que el T3SS suprime la respuesta de defensa temprana en soja Williams mediada por SA, ya que la transcripción del gen *GmPRI*, considerado como marcador de la SAR, no se induce en plantas inoculadas con la estirpe parental. Además, se produjo un aumento significativo de la producción de SA en las hojas de las plantas inoculadas con el mutante HH103 *ttsI::Ω*, lo que indicaría una posible señalización sistémica (**Figura 26, B**). Por todo ello, se decidió realizar un ensayo para confirmar si el mutante HH103 *ttsI::Ω* induce una respuesta sistémica con características similares a la SAR, por lo que la planta podría estar parcialmente protegida ante una infección secundaria por un patógeno. Los ensayos se realizaron con plantas de soja Williams inoculadas con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y su derivado complementado HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984). Tras 10 d.p.i. las hojas de la planta se inocularon con el patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*.

Los resultados mostraron altos niveles de necrosis foliar en las plantas sin inocular y en las inoculadas con la estirpe parental HH103 y la complementada. Sin embargo, las zonas necróticas no llegaron a invadir el total de la zona infectada por *P. syringae* en las hojas de las plantas inoculadas con las estirpe mutante HH103 *ttsI*:: Ω . Esto indicaría que la ausencia del T3SS desencadena una respuesta de defensa en la planta en la que se encuentran involucradas moléculas de señalización sistémica (**Figura 36**).

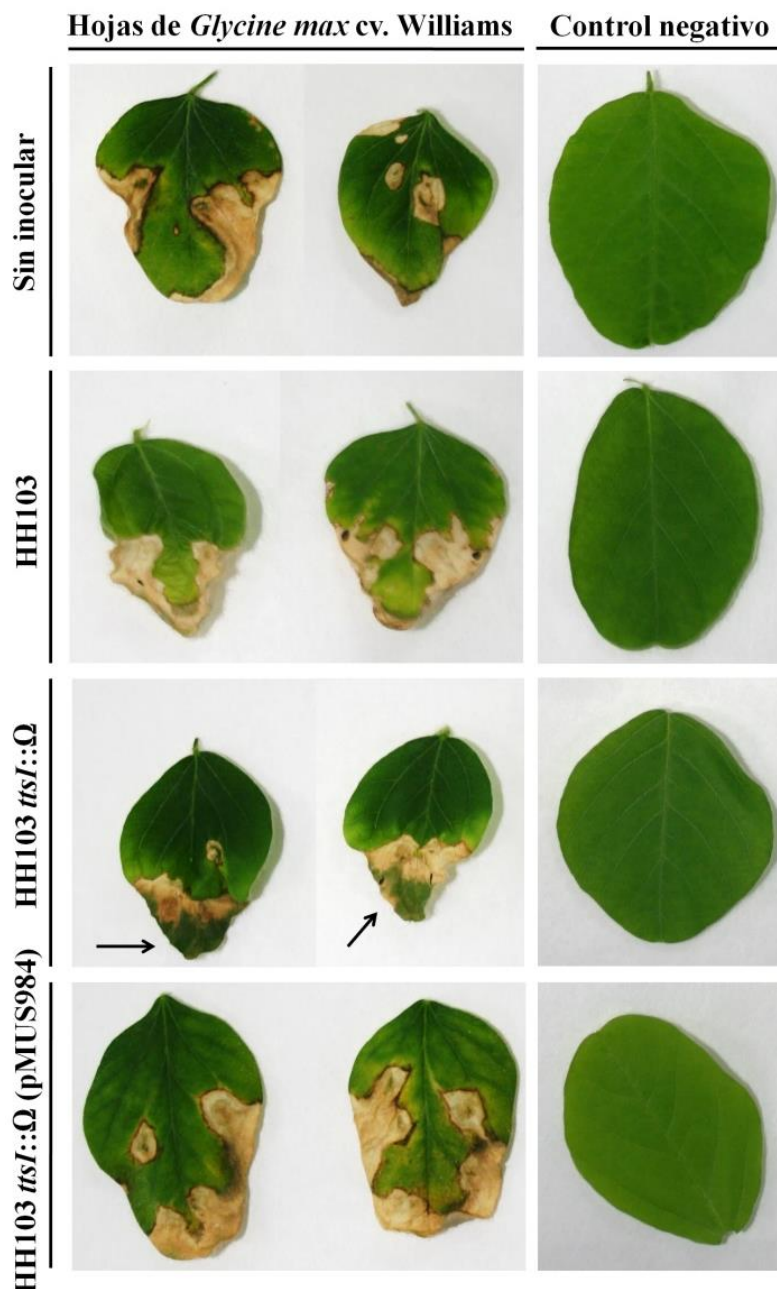


Figura 36. Respuesta de soja Williams a la inoculación en las hojas con *P. syringae* y preinoculada en la raíz con las estirpes HH103, HH103 *ttsI*:: Ω y HH103 *ttsI*:: Ω (pMUS984). Las flechas indican las zonas más representativas del control de la infección por *P. syringae*.

2. 5. El T3SS *S. fredii* HH103 induce de forma transitoria la expresión del gen *GmMPK4* en las raíces de soja Williams.

El reconocimiento de las moléculas MAMP por parte de la planta induce una serie de respuestas como la activación de rutas de señalización de proteínas MAPK. Éstas controlan la síntesis y/o la señalización de las hormonas involucradas en defensa, activan genes relacionados con la defensa, promueven la síntesis de agentes antimicrobianos y activan la HR, pudiendo dar lugar a la SAR a través de SA (Meng y Zhang, 2013; Zhang y Klessing, 2001). *Arabidopsis thaliana* es la planta modelo en la que se ha estudiado más en profundidad las rutas de las MAPK. Se han descrito dos grupos principales de MAPK involucradas en la defensa de la planta. Por un lado, se ha comprobado la interacción entre las quinasas MKK4/MKK5 y MPK3/MPK6 y, por el otro, se ha determinado la existencia de otra ruta comúnmente denominada como MKK1-MKK2/2-MPK4. Además, la quinasa MPK4 se considera un regulador negativo de la producción de SA y ROS en la respuesta de defensa y como regulador positivo en el crecimiento y desarrollo de la planta en *A. thaliana* y en soja (Liu *et al.*, 2011).

La expresión del gen *GmMPK4* se estudió para conocer si esta quinasa juega un papel en la regulación negativa de la producción de SA y en la modulación de la respuesta de defensa de soja Williams frente a *S. fredii* HH103. La **Figura 37** muestra que el gen *GmMPK4* se indujo a los 2 d.p.i. en las plantas inoculadas con la estirpe silvestre HH103, mientras que este mismo gen se reprimió en las raíces de las plantas inoculadas con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* a los 4 d.p.i., en comparación con las plantas control sin inocular. A los 8 d.p.i. no se observó expresión en ninguno de los tratamientos y la complementación de la mutación restableció parcialmente los valores del mutante llegando a ser similares a los de la estirpe silvestre.

Sin embargo, el análisis mediante *western blot* de la cantidad de proteína MPK4 en las raíces de soja no mostró diferencias significativas entre los distintos tratamientos ensayados y las plantas control sin inocular. Por lo tanto, la cantidad de proteína MPK4 no se correlacionó con la expresión del gen *GmMPK4* (**Figura 38**) en los puntos muestreados. Esto podría deberse a que exista un pico de producción concreto de esta enzima, lo cual hace complicado que la toma de la muestra para la realización del *western blot* se realice justamente en el pico de expresión de este gen.

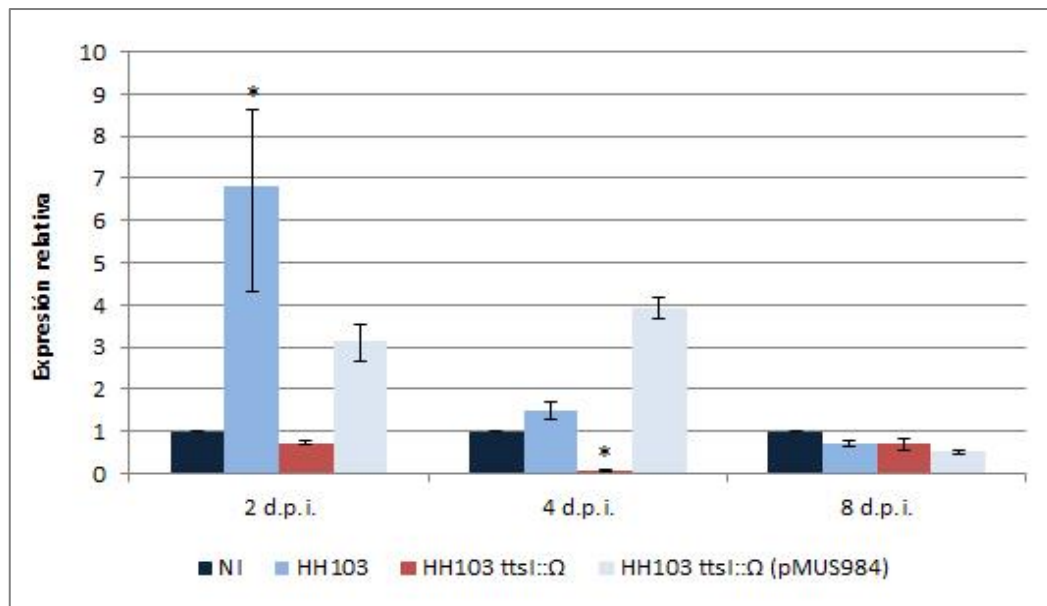


Figura 37. Cuantificación mediante *qPCR* de la expresión del gen *GmMPK4* de la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984). Los datos representan la media de 3 réplicas de 2 extracciones de ARN independientes. Los valores de la estirpe mutante se compararon individualmente con los de la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

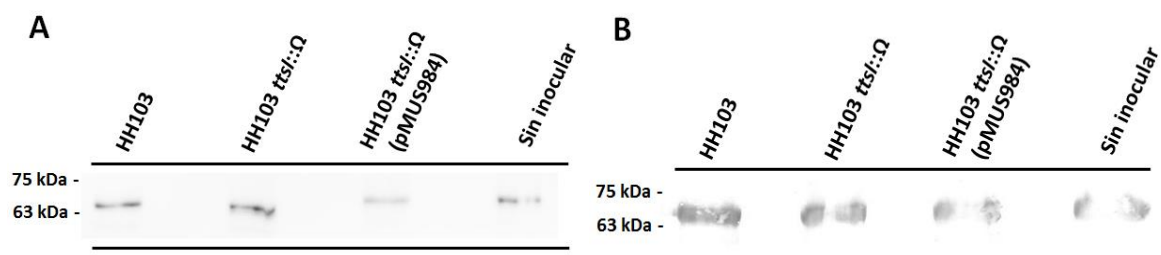


Figura 38. Inmunodetección de la proteína MPK4 en la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984). **A**, raíces inoculadas a los 2 d.p.i.; **B**, raíces inoculadas a los 4 d.p.i..

En soja, la proteína MPK4 regula negativamente la transcripción del gen *GmWRKY33*, que codifica un factor de transcripción involucrado en la respuesta de defensa (Liu *et al.*, 2011). Así, la expresión del gen *GmWRKY33* se estudió con el fin de confirmar la activación de esta ruta de señalización. Los resultados representados en la **Figura 39** mostraron que este gen se activó a los 8 d.p.i. (alrededor de 4 veces) en las plantas inoculadas con el mutante HH103 *ttsI::Ω* respecto a las raíces de las plantas

control sin inocular. Estos niveles de expresión no se observaron en las raíces de las plantas inoculadas en con la estirpe parental HH103.

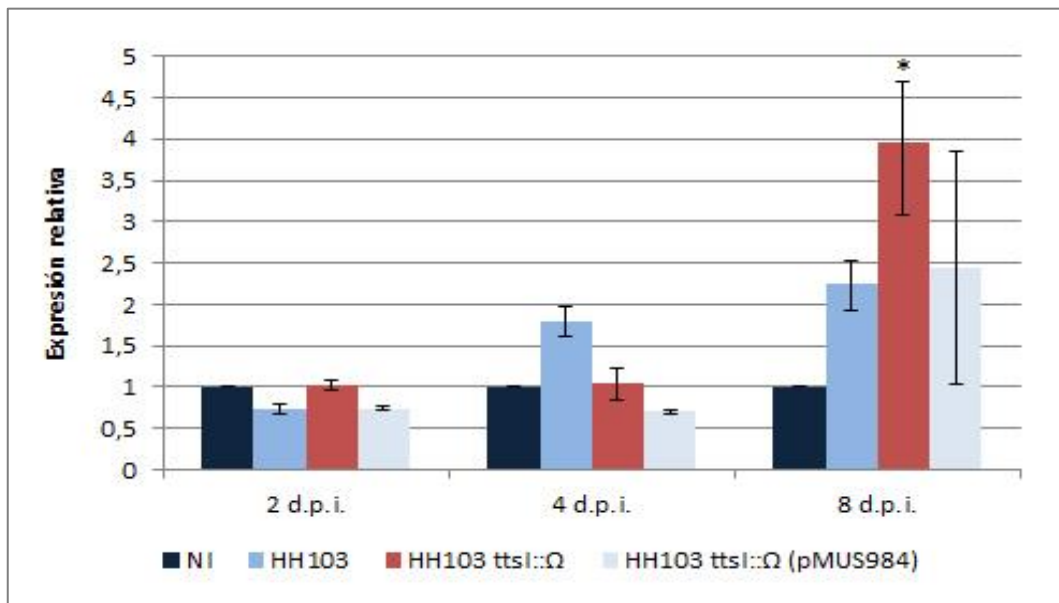


Figura 39. Cuantificación mediante *qPCR* de la expresión del gen *GmWRKY33* de la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y HH103 *ttsI::Ω* (pMUS984). Los datos representan la media de 3 réplicas de 2 extracciones de ARN independientes. Los valores de la estirpe mutante se compararon individualmente con los de la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

A partir de los resultados obtenidos en este apartado se pueden destacar las siguientes conclusiones:

Los resultados obtenidos sobre la expresión del gen *MPK4* demuestran que los efectores del T3SS interfieren en la ruta de señalización de las MAP quinasas MKK1-MKK2/2-MPK4, considerado como regulador negativo del SA.

Durante el proceso de infección de la soja por *S. fredii* HH103, los efectores del T3SS podrían mantener los niveles de SA controlados mediante la activación de la expresión del gen *GmMPK4*. De esta forma, no llegaría a activarse el factor de transcripción *GmWRKY33*, impidiendo la transcripción de numerosos genes de defensa de la planta de soja (**Figura 40**).

En ausencia del T3SS, los niveles de de SA se dispararían, desencadenando la activación del gen *GmPR1*, llegando a reprimir el gen *GmMPK4*, lo que conduciría a la activación del gen *GmWRKY33* y multitud de genes de defensa (**Figura 40**).

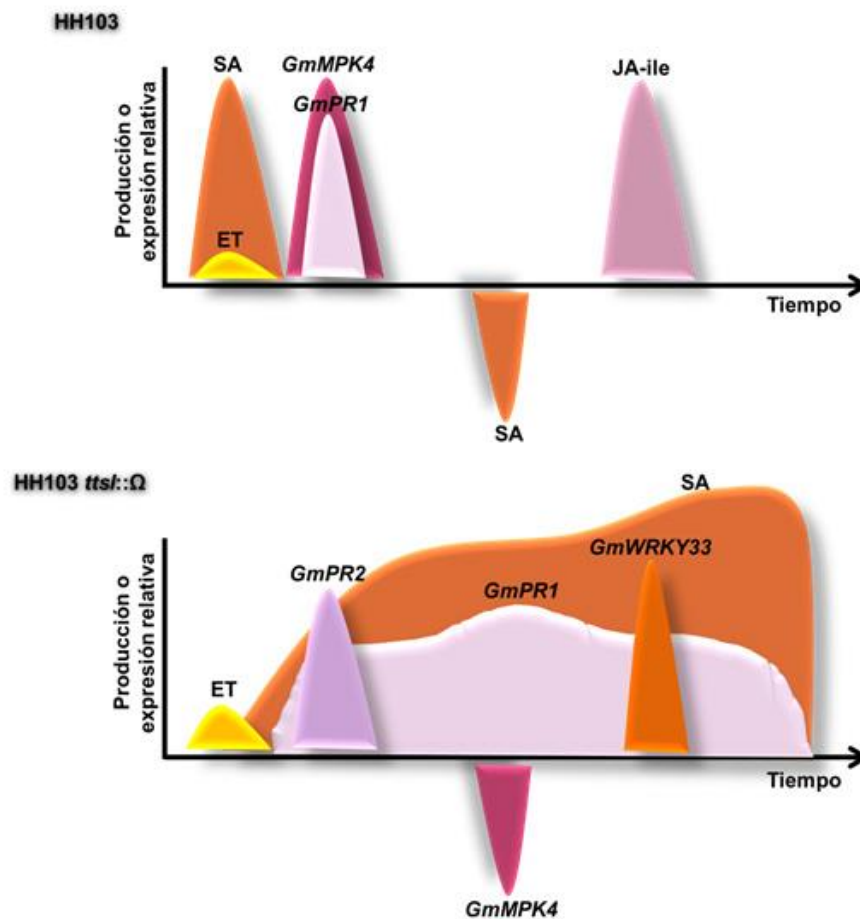


Figura 40. Esquema de los procesos activados en la raíz de soja Williams mediante la inoculación con la estirpe parental HH103 y el mutante carente del T3SS HH103 *ttsI::Ω*.

Bloque II

Caracterización de los genes *nopP*, *nopL*, *nopI* y *nopC* de *S. fredii* HH103 que codifican efectores específicos de rizobios

Antecedentes

Hasta el momento se han identificado 9 proteínas Nop en *S. fredii* HH103: NopA, NopB, NopC, NopD, NopL, NopM, NopP, NopT y NopX. NopA y NopB son componentes de la estructura del apéndice extracelular o *pilus* del T3SS y NopX podría actuar como translocador de las proteínas efectoras al interior de la célula hospedadora. NopC es específica de los rizobios y se encuentra presente en las estirpes NGR234, USDA257 y HH103 de *S. fredii*. En la literatura, diversos autores han considerado esta proteína como parte de la estructura del T3SS por su localización en el genoma y por su tamaño, muy similar al de NopA. Sin embargo, no existe ningún estudio sobre su función como parte estructural del T3SS.

De las posibles proteínas efectoras de *S. fredii* HH103, es decir, aquellas que son translocadas al interior de la célula hospedadora ejerciendo una función sobre ella, se han identificado las siguientes: NopD, NopL, NopM, NopP y NopT, de las cuales NopL y NopP son específicas de los rizobios. En esta estirpe solo se ha caracterizado el gen *nopP* (López-Baena *et al.*, 2009) y se comprobó que el mutante afectado en este gen mejoró las características simbióticas en soja Williams con respecto a las obtenidas en plantas inoculadas con la estirpe parental.

En esta Tesis, y gracias a la secuenciación del genoma completo de *S. fredii* HH103 (Vinardell *et al.*, 2015), se han analizado otros posibles efectores y se han caracterizado aquellos que son específicos de los rizobios. Además, se han utilizado las herramientas necesarias para estudiar si éstos se translocan al interior de la célula hospedadora.

1. Caracterización del gen *nopL* de *S. fredii* HH103.

1. 1. Análisis de las secuencias del gen *nopL* y de la proteína NopL de *S. fredii* HH103.

El análisis de la comparación de la secuencia del gen *nopL* de *S. fredii* HH103 (HE616895) frente a los correspondientes genes presentes en otros rizobios reveló que este gen comparte un 98%, 100% y 68% de identidad con los genes *nopL* de *S. fredii* NGR234 (U00090), *S. fredii* USDA257 (CP003565) y *B. elkanii* USDA61 (FM162234), respectivamente. Además, este gen no es homólogo a otros genes relacionados con el T3SS de otros organismos no rizobianos.

El análisis de la comparación de las secuencias de aminoácidos de NopL de estos rizobios mostró que la proteína NopL de *S. fredii* HH103 (338 aa, YP_006575344.1) posee un 100% de identidad con la proteína NopL de *S. fredii* USDA257 (338 aa, AAL98685), un 96% de identidad con la de la estirpe *S. fredii* NGR234 (338 aa, NP_444148.1) y un 51% de identidad con la proteína NopL de *B. elkanii* USDA61 (173 aa, CAQ57553.1) (**Figura 41**).

HH103	1	MDINSTRPLNASPQPDSPPPANESAFAHQLSGFQYSPPHAADSLLPQVEADSPYLDTGHP
USDA257	1	MDINSTRPLNASPQPDSPPPANESAFAHQLSGFQYSPPHAADSLLPQVEADSPYLDTGHP
NGR234	1	MDINSTSPLNASPQPDSPPPANASAFAHQLSGFQYSPPHAADSLLPQVEADSPYLDTRHP
<i>B. elkanii</i>	1	-----LDARHP
HH103	61	YSQYLDAYPYPSPCWQHDLYTRTRERSHPHPSEQRPHARVLQDAPEHDQDQHVAAAGPR
USDA257	61	YSQYLDAYPYPSPCWQHDLYTRTRERSHPHPSEQRPHARVLQDAPEHDQDQHVAAAGPR
NGR234	61	YSQYLDAYPYPSPCWQHDLYTRTRERSHPHPSEQRPHARVLQGAPEHDQDQHLEAAGPR
<i>B. elkanii</i>	7	YSQYLSSCHPYSS-----
HH103	121	AGSWQVGPSRSGPSQAGPSSSATPLNASPPPHATDLETEHPYSQYLDWANPSLLDWQHDL
USDA257	121	AGSWQVGPSRSGPSQAGPSSSATPLNASPPPHATDLETEHPYSQYLDWANPSLLDWQHDL
NGR234	121	EGSWQVGPSRSGPSQAGLSPSATPLNPSPPPHATDLETKEHPYSQYLDWANPSLLDWQQL
<i>B. elkanii</i>	20	-----LLDREDDI

HH103	181	HTRATASPAPLTAERGKSPQPSEQQPHAR-ALQVPEYDQDLIWQRVDAAGPQAGPWQVGP
USDA257	181	HTRATASPAPLTAERGKSPQPSEQQPHAR-ALQVPEYDQDLIWQRVDAAGPQAGPWQVGP
NGR234	181	HTRATASPAPLTAERGRSPQPSEQQPHAR-ALQVPEYDQDLIWQRVDAAGPQAGPWQVGP
<i>B. elkanii</i>	28	YAPAAFSFGPLVAARESSPQPGSQQFTAQAIAPLPEIDFDLIWQNVLAGSSQAGPSQAGP
HH103	240	SHSGPSQARPSHAWPSSSAGAEPTELSDFVMDSGVRAWDHWFAPHMASEDQMSMLRATG
USDA257	240	SHSGPSQARPSHAWPSSSAGAEPTELSDFVMDSGVRAWDHWFAPHMASEDQMSMLRATG
NGR234	240	SHSGPSQARPSHAWPSSSAGAEPTELSDFVMDSGVRAWDHWFAPHMASEDQMSMLRATG
<i>B. elkanii</i>	88	SQAGP-----SSSAGAALSELNFTPEDERFIAADHWVFCPTASDAQINILRRAG
HH103	300	LMPTAEVPTTTFLMMGMPHVAEFRGEGVIRIRPSLDFDI
USDA257	300	LMPTAEVPTTTFLMMGMPHVAEFRGEGVIRIRPSLDFDI
NGR234	300	LMPTAEVPTTTFLMMGMRHVAEFRGEGVIRIRPSLDFDI
<i>B. elkanii</i>	138	LIPSNNSRRTTSFTMLGMPHTAEFRQEGEVRIKPSMD---

Figura 41. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína NopL de *S. fredii* HH103 con las correspondientes proteínas homólogas de *S. fredii* NGR234, *S. fredii* USDA257 y *B. elkanii* USDA61. En negro se muestran los residuos idénticos entre las distintas secuencias de aminoácidos y en gris los residuos similares.

1. 2. Construcción de un mutante en el gen *nopL* de *S. fredii* HH103.

El mutante en el gen *nopL* se construyó mediante la inserción del interosón Ω . Para ello se partió del plásmido pMUS1007, que porta un fragmento de PCR de 1,1 kb que contiene el gen *nopL* de HH103 clonado en el plásmido pK18*mob*. Este plásmido se digirió con la enzima *EcoRV*, cuya única diana presente en pMUS1007 se encuentra situada en el interior de la secuencia del gen *nopL*, y el plásmido linearizado de 4,8 kb se ligó con un fragmento de 2 kb que contiene el interosón Ω digerido con *SmaI* y obtenido a partir del plásmido pHP45. La inserción del interosón Ω en el gen *nopL* mediante esta estrategia dio lugar al plásmido pMUS1095 (**Figura 42**). Finalmente, este plásmido se homogenizó en la estirpe parental HH103 y se obtuvo el mutante SVQ694 (= HH103 *nopL*:: Ω).

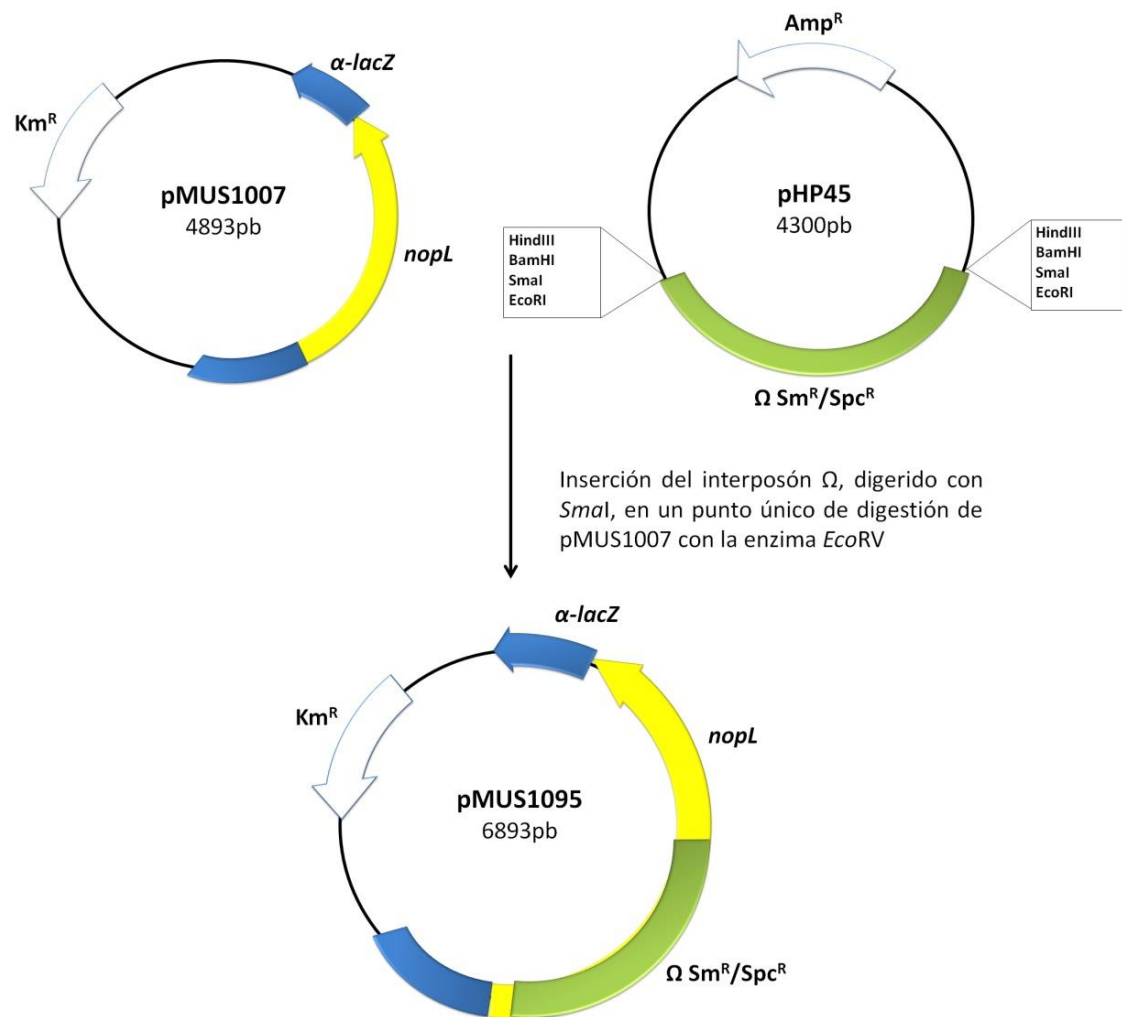


Figura 42. Esquema de la mutagénesis *in vitro* del gen *nopL* mediante la inserción del interposón Ω .

La homogenización de la mutación se confirmó mediante hibridación, digiriendo el ADN total de la estirpe parental HH103 y del mutante HH103 *nopL*:: Ω con la enzima *EcoRI*. Como sonda de hibridación se usó el producto de PCR amplificado con los cebadores *nopLF* y *nopLR*, que lleva incorporado nucleótidos marcados con digoxigenina (**Figura 43**). Mediante el ensayo de hibridación se comprobó que la estirpe mutante HH103 *nopL*:: Ω presentaba una banda 2 kb mayor a la de la estirpe silvestre, correspondiente a la inserción del interposón Ω en el gen *nopL*.

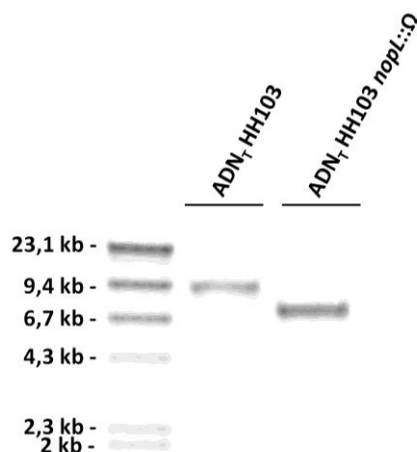


Figura 43. Comprobación mediante hibridación del mutante HH103 *nopL::Ω*. El ADN genómico de las estirpes HH103 y HH103 *nopL::Ω* se digirió con la enzima *EcoRI*. A la izquierda de la imagen se representan los tamaños del marcador λ *HindIII*.

La complementación de la mutación se realizó amplificando mediante PCR una secuencia de 2,2 kb a partir del ADN genómico de la estirpe parental HH103, que contiene el gen *nopL* e incluye la caja *tts* de su región promotora. Para ello se utilizaron los cebadores *nopL*ext-F y *nopL*ext-R y el producto de la PCR se clonó en el vector pMBL-T, generando el plásmido pMUS1145. El ADN plasmídico de esta construcción se digirió con las enzimas *BamHI/HindIII* y el fragmento liberado de 2,2 kb, que contenía el gen *nopL*, se subclonó en el plásmido pMP92, cortado con las mismas enzimas, dando lugar a una nueva construcción denominada pMUS1191. Este plásmido se conjugó con el mutante HH103 *nopL::Ω* obteniéndose la estirpe complementada HH103 *nopL::Ω* (pMUS1191) (**Figura 44**).

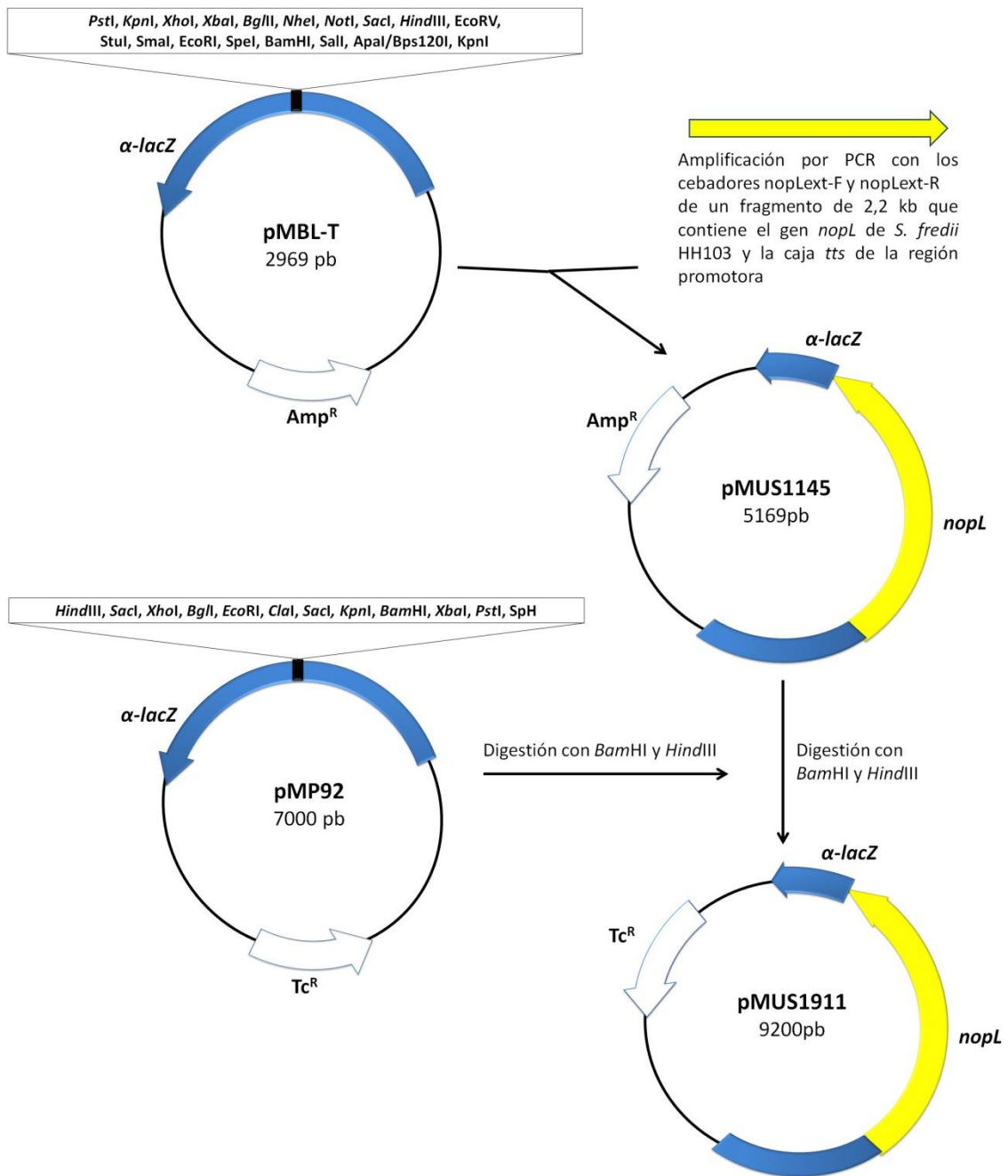


Figura 44. Esquema de la construcción del plásmido pMUS1191 para complementar la mutación en el gen *nopL*.

1. 3. Estudio de la regulación de la expresión gen *nopL*.

Mediante experimentos de *qPCR* se comprobó si la expresión del gen *nopL* de HH103 se encuentra regulada por flavonoides, por la proteína NodD1 y por el regulador transcripcional TtsI. Para ello se extrajo el ARN total de la estirpe parental HH103, del mutante HH103 *nodD1::lacZ-Gm^R* y del mutante HH103 *ttsI::Ω*, y se midió la expresión del gen *nopL* a partir de cultivos de estas estirpes no inducidos e inducidos con el flavonoide genisteína a una concentración de 3,7 μM . Los resultados obtenidos mostraron que el gen *nopL* solo se transcribió en el cultivo de la estirpe parental (20 veces) suplementada con genisteína. No se observó activación de este gen en ninguna de las otras condiciones, de modo que la transcripción del gen *nopL* depende de flavonoides, de la proteína reguladora NodD1 y del regulador transcripcional del T3SS TtsI (**Figura 45**).

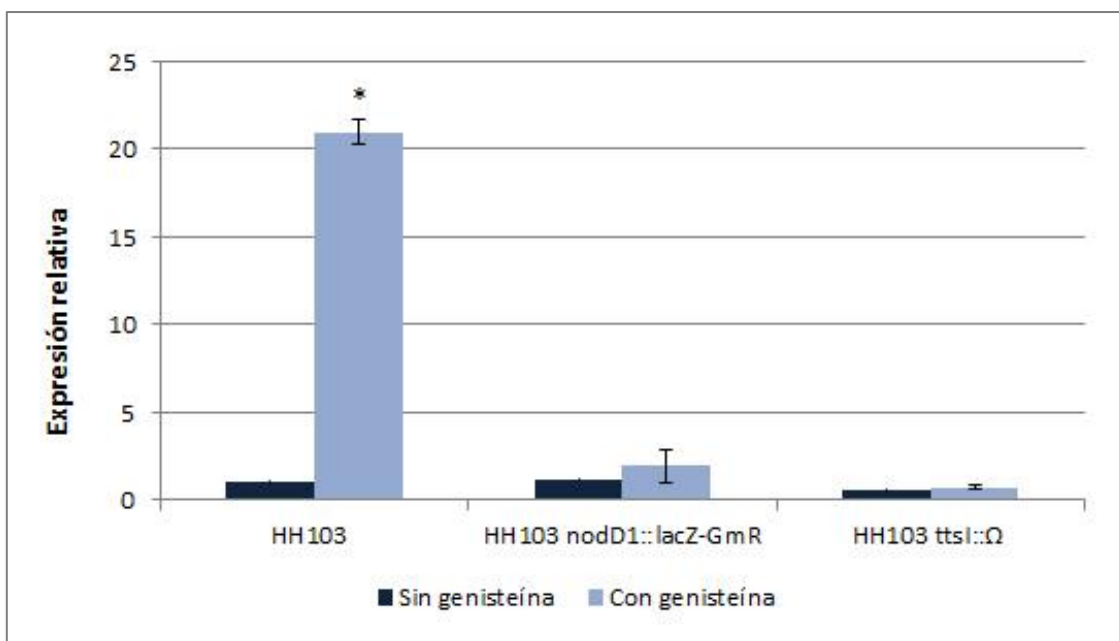


Figura 45. Análisis por *qPCR* de la expresión del gen *nopL* de HH103. El ADNc utilizado para este análisis proviene de cultivos de las estirpes HH103, HH103 *nodD1::lacZ-Gm^R* y HH103 *ttsI::Ω* crecidos en presencia o ausencia de genisteína a una concentración de 3,7 μM . El gen *16S* se utilizó como control. Los datos representan las medias de 3 réplicas de 2 extracciones de ARN independientes. Cada tratamiento se comparó individualmente con los datos de la estirpe silvestre sin genisteína usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

1. 4. Efecto de la mutación del gen *nopL* sobre la secreción de las proteínas Nop.

Los perfiles de las proteínas extracelulares secretadas por la estirpe mutante HH103 *nopL::Ω*, provenientes de los cultivos no inducido e inducido con genisteína, se compararon con los obtenidos con la estirpe parental HH103. Aunque solo existe una copia del gen *nopL*, los geles de proteínas extracelulares mostraron en la mayoría de los ensayos dos proteínas equivalentes a NopL, una de ~37 kDa y otra de ~34 kDa. Este fenotipo se describió previamente en el trabajo de **Rodrigues et al. (2007)**, donde se sugiere que estas dos bandas podrían ser isoformas de la misma proteína, siendo la de menor tamaño el producto de la degradación de la de mayor peso molecular. En cualquier caso, los resultados mostrados en la **Figura 46 (A)** indican que el mutante HH103 *nopL::Ω* solo deja de secretar la proteína NopL y no afecta a la secreción del resto de las proteínas Nop. Además, la complementación de la mutación del gen *nopL* mediante la transferencia del plásmido pMUS1191 a la estirpe HH103 *nopL::Ω* restauró la secreción de la proteína NopL (**Figura 46, A y B**).

Los resultados observados en los geles de proteínas se confirmaron mediante el uso de un anticuerpo específico anti-NopL obtenido a partir de la proteína NopL de *S. fredii* NGR234 (cedido por el Dr. Deakin del LBMPs de la Universidad de Ginebra, Suiza). En la **Figura 46 (B)** se observa la aparición de la señal en los carriles correspondientes a los cultivos inducidos con genisteína de la estirpe parental HH103 y de la complementada HH103 *nopL::Ω* (pMUS1191) y no en los carriles correspondientes a los cultivos no inducidos de estas estirpes ni a los del mutante HH103 *nopL::Ω*, ya fuese no inducido o inducido con el flavonoide inductor.

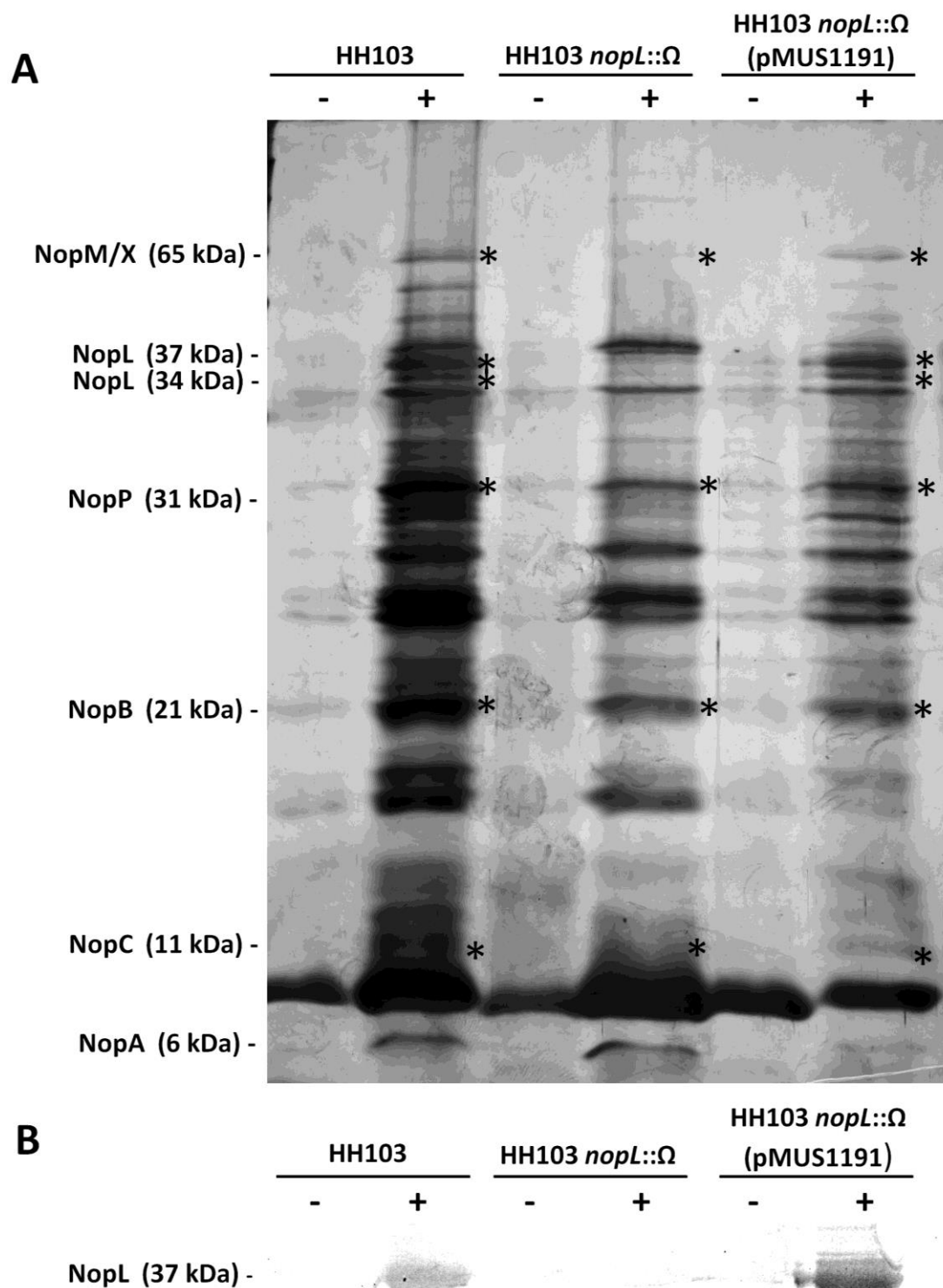


Figura 46. **A**, perfil de las proteínas extracelulares. **B**, inmunodetección de la proteína NopL. En ambos casos las proteínas proceden de cultivos de las estirpes HH103, HH103 *nopL*:: Ω y HH103 *nopL*:: Ω (pMUS1191) crecidas en presencia (+) o ausencia (-) de genisteína a una concentración de 3,7 μ M. Las masas moleculares (kDa) del marcador (Bio-Rad, EEUU) se usaron para inferir las masas moleculares (indicadas a la izquierda) de las proteínas cuya secreción depende de genisteína, marcadas con un asterisco.

1. 5. NopL es translocada al interior de las células de la raíz de soja.

Hasta el momento solo ha sido confirmada la translocación de los efectores rizobianos NopP de *S. fredii* USDA257 y NopE1 y NopE2 de *B. japonicum* al interior del citoplasma de la célula vegetal (Schechter *et al.*, 2010; Wenzel *et al.*, 2010). La confirmación de la translocación del efector NopL al interior de la célula eucariota se llevó a cabo mediante la fusión del gen *cya* de *Bordetella pertusis* al extremo carboxilo terminal del gen *nopL* HH103 y la integración de esta fusión en el genoma de HH103. La estirpe resultante se inoculó en la raíz de soja Williams y se midió la concentración de AMPc, producto de la reacción que cataliza la enzima adenilato ciclasa dependiente de calmodulina, codificada por el gen *cya*.

Para ello se amplificó el gen *nopL* mediante PCR usando los cebadores attB1NopL y nopLattB2sinstop y usando como ADN molde el ADN total de la estirpe HH103. El amplicón de ~1,1 kb, correspondiente al gen *nopL* sin codón de stop, se clonó en el vector pDONR207 dando lugar a pMUS1243 y, posteriormente, en pLMS150 generando pMUS1259, que porta el gen *nopL* en fase con el gen *cya*. Todo ello se realizó mediante el sistema de clonación Gateway (Invitrogen). Seguidamente, se realizó una PCR usando como ADN molde el ADN plasmídico de pMUS1259 y los cebadores nopL_HindIII y cya_BamHI, que amplificaron un fragmento de ~2,2 kb que contenía la fusión *nopL-cya* y las dianas de restricción *Bam*HI y *Hind*III en los extremos. El amplicón y el plásmido pK18*mob* se digirieron con las enzimas *Bam*HI/*Hind*III y ambos fragmentos se ligaron para dar lugar al plásmido pMUS1294 (Figura 47). Por último, la fusión *nopL-cya* se integró en el genoma de HH103 mediante conjugación y recombinación simple usando como estirpes receptoras HH103 y HH103 *ttsI::Ω*. Posteriormente, las estirpes HH103, HH103 (*nopL-cya*) y HH103 *ttsI::Ω* (*nopL-cya*) se inocularon en la raíz de plantas de soja Williams. A los 18 d.p.i. se recogió el primer tercio de la raíz y se cuantificó la concentración de AMPc, indicativo de la actividad adenilato ciclasa en el interior de la célula eucariota.

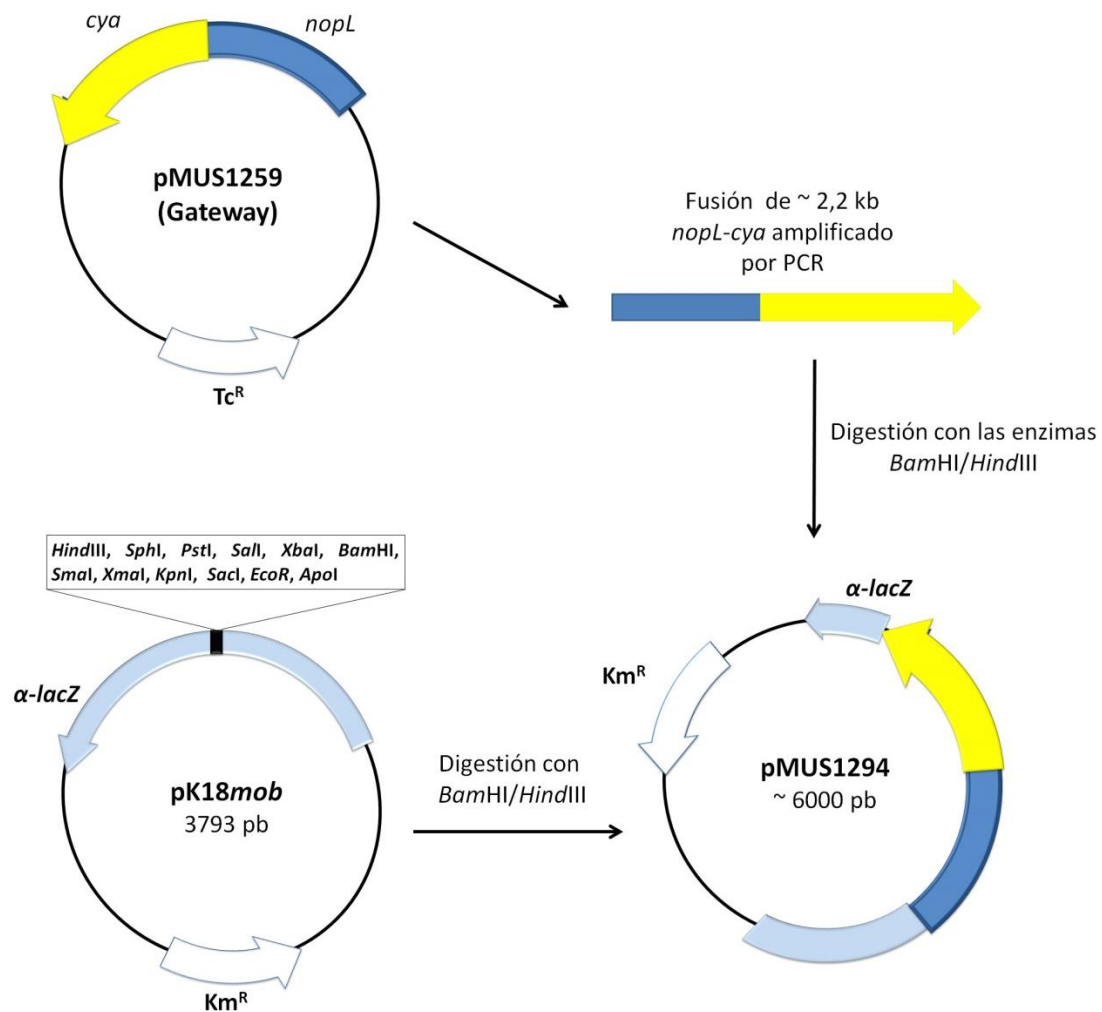


Figura 47. Esquema de la construcción del plásmido pMUS1294, utilizado para la cuantificación de AMPc en las raíces de soja Williams.

Los resultados obtenidos demostraron que el efector NopL de HH103 es translocado al interior de las células de la raíz de soja Williams (**Figura 48**). Así, las raíces inoculadas con la estirpe HH103 (*nopL-cya*) mostraron una alta concentración de AMPc, indicando que la proteína de fusión NopL-Cya se encontraba en el interior de la célula vegetal, produciendo AMPc a partir de ATP mediante el enzima Cya de *B. pertusis*. Como control se incluyeron las estirpes HH103 y HH103 *ttsI::Ω* (*nopL-cya*), de modo que las raíces inoculadas con ambas estirpes debían contener una concentración muy baja de AMPc, únicamente originado por la actividad basal de la adenilato ciclasa propia de la célula vegetal.

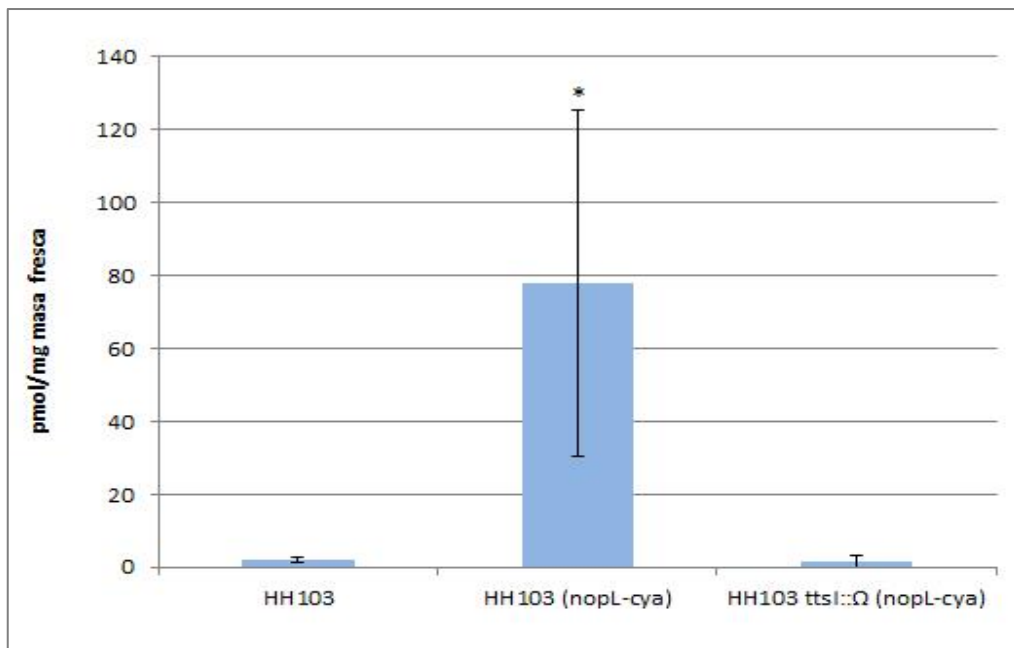


Figura 48. Cuantificación de AMPc de la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 (*nopL-cya*) y HH103 *ttsI::Ω* (*nopL-cya*). Los datos representan la media de 3 réplicas de 2 ensayos independientes. Cada tratamiento se comparó individualmente con los datos obtenidos con la estirpe parental HH103 usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

2. Caracterización del gen *nopI* de *S. fredii* HH103.

2. 1. Identificación y análisis de las secuencias del gen *nopI* y de la proteína NopI de *S. fredii* HH103,

La secuenciación del genoma de HH103 (Vinardell *et al.*, 2015) permitió la identificación de un nuevo gen que presenta en su región promotora una caja *tts*, por lo que, presumiblemente, podría estar regulado por la proteína TtsI, activador transcripcional de los genes del T3SS. El gen *nopI* de *S. fredii* HH103 (HE616893) presenta un 100% de identidad con un gen de la estirpe *S. fredii* USDA257 (CP003565) no anotado. Además, la secuencia de ADN correspondiente a una parte de la región carboxilo terminal de la proteína NopI de *S. fredii* HH103 (AY775562) posee un 68% de identidad y un 35% de cobertura con la correspondiente secuencia del gen *nopP* de *S. fredii* HH103. El análisis de la secuencia de la proteína NopI de *S. fredii* HH103 mostró

que ésta comparte un 99% de identidad con una proteína de *S. fredii* USDA257 (285 aa, no anotada) y con otra de la estirpe *Ensifer* sp. TW10 (285 aa, 026616852) (**Figura 49**).

HH103	1	MYSSITGSASQSTSASQADESGQAADDQTFETLAEAAAGSSASRLYSLTSEPPPIYELD
USDA257	1	MYSSITGSASQSTSASQADESGQAADDQTFETLAEAAAGSSASRLYSLTSEPPPIYELD
TW10	1	MYSRITGSASQSTSASQADESGQAADDQTFETLAEAAAGSSASRLYSLTSEPPPIYELD
HH103	61	RKTFEKELKNFCSDDVKHIADNPLEYSDFVSKKAERTAMVARVGASVADKPGAQYFSYQL
USDA257	61	RKTFEKELKNFYSDVKHIADNPLEYSDFVSKKAERTAMVARVGASVADKPGAQYFSYQL
TW10	61	RKTFEKELKNFYSDVKHIADNPLEYSDFVSKKAERTAMVARVGASVADKPGAQYFSYQL
HH103	121	GDKSVGLLRVDPGFRIKGDWQKEHFPERKNISSVVAMRVTHPLVENAGDVLLEHQRLD
USDA257	121	GDKSVGLLRVDPGFRIKGDWQKEHFPERKNISSVVAMRVTHPLVENAGDVLLEHQRLD
TW10	121	GDKSVGLLRVDPGFRIKGDWQKEHFPERKNISSVVAMRVTHPLVENAGDVLLEHQRLD
HH103	181	GKKPLIMSRPANDDPRPRLEQMGFVDVGGNEFVLDPKRHGDKWTLNGDREWQRADKPRQY
USDA257	181	GKKPLIMSRPANDDPRPRLEQMGFVDVGGNEFVLDPKRHGDKWTLNGDREWQRADKPRQY
TW10	181	GKKPLIMSRPANDDPRPRLEQMGFVDVGGNEFVLDPKRHGDKWTLNGDREWQRADKPRQY
HH103	241	LQAESEDPVEGRSDENEGYVETDSSSDPSWYLERALNFRGGPAD
USDA257	241	LQAESEDPVEGRSDENEGYVETDSSSDPSWYLERALNFRGGPAD
TW10	241	LQAESEDPVEGRSDENEGYVETDSSGDDPSWYLERALNFRGGPAD

Figura 49. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína NopI de *S. fredii* HH103 con las proteínas de *S. fredii* USDA257 y de *Ensifer* sp. TW10. En negro se muestran los residuos idénticos entre las distintas secuencias de aminoácidos. En rojo se muestran los residuos correspondientes al posible dominio de tipo EPIYA.

La proteína NopI posee una secuencia de aminoácidos (EPPIYE) similar al dominio EPIYA que presentan algunos efectores de bacterias patógenas (**Backert y Selbach, 2005**). Los efectores denominados EPIYA y aquellos que poseen un dominio similar son fosforilados en el aminoácido tirosina de este dominio e interaccionan con diferentes proteínas que presentan un dominio SH2 y que intervienen en la señalización intracelular del organismo hospedador. De esta forma, las bacterias patógenas que poseen este efector manipulan las funciones de la célula para aumentar la efectividad de la infección y mejorar la colonización del hospedador (**Backert et al., 2010; Hayashi et al., 2013; Selbach et al., 2009**). Hasta el momento se han identificado 9 efectores EPIYA que no presentan ninguna homología en su secuencia más allá del dominio descrito (**Hayashi et al., 2013**). El análisis de los aminoácidos de la proteína NopI de *S.*

fredii HH103 utilizando el programa “NetPhos 2.0 Server” indicó que la tirosina del dominio EPPIYE es potencialmente fosforilable (**Figura 50**).

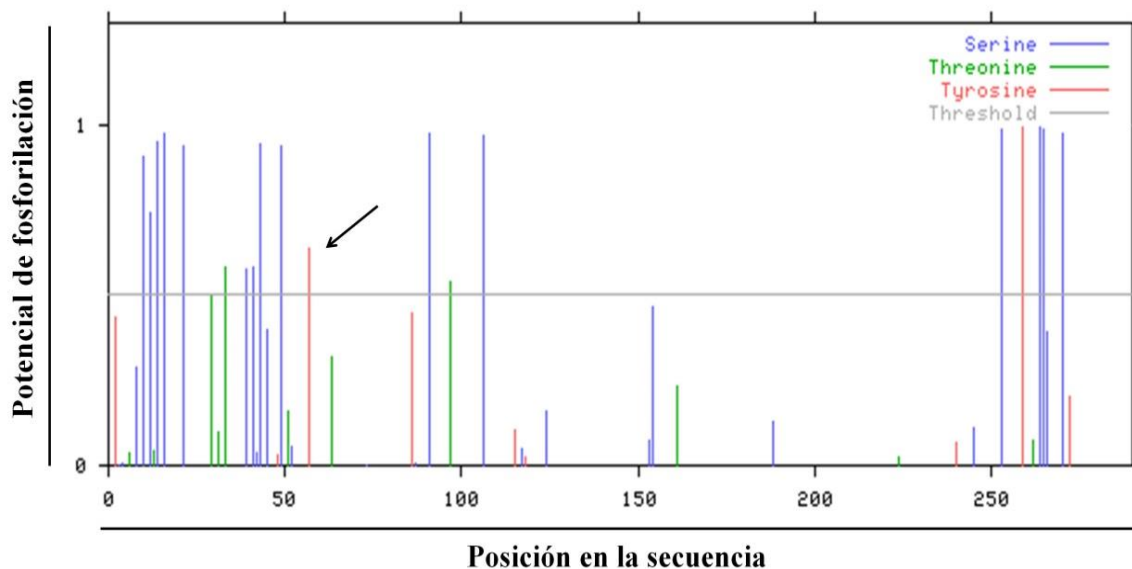


Figura 50. Predicción de los aminoácidos fosforilables de la proteína NopI de HH103 utilizando el programa “NetPhos 2.0 Server”. En azul se representan las posiciones de las serinas, en verde las posiciones de las treoninas y en rojo las posiciones de las tirosinas. La flecha indica la posición de la tirosina del dominio EPPIYE.

2. 2. Construcción de un mutante en el gen *nopI* de *S. fredii* HH103.

La construcción del mutante en el gen *nopI* se realizó mediante el método de delección por PCR solapante. Para ello se diseñaron cuatro cebadores:

- **nopI-1:** posee la diana de restricción reconocida por la enzima *Bam*HI seguida de una secuencia homóloga a un fragmento de ADN situado aguas arriba del gen *nopI*.
- **nopI-2:** posee una secuencia complementaria a un fragmento localizado en el comienzo del gen *nopI*.
- **nopI-3:** contiene una secuencia homóloga a un fragmento situado al final del gen *nopI*.
- **nopI-4:** posee una secuencia complementaria a un fragmento de ADN situado aguas abajo del gen *nopI* y porta la diana de restricción para la enzima *Hind*III.

En primer lugar, se realizó una PCR utilizando como ADN molde el ADN total de la estirpe HH103 y los cebadores *nopI-1* y *nopI-2* para amplificar un fragmento de 334 pb. A continuación, se realizó una segunda PCR con el ADN total de HH103 y los cebadores *nopI-3* y *nopI-4* y se amplificó un fragmento de 570 pb. Por último, en la tercera PCR se utilizó como ADN molde los dos fragmentos obtenidos anteriormente y los cebadores *nopI-1* y *nopI-4*. De esta forma se amplificó un fragmento de ~0,9 pb que portaba las secuencias aguas arriba y abajo del gen *nopI*, y que presentaba una delección de 759 pb, como se comprobó mediante la secuenciación del fragmento de ~0,9 pb. El fragmento deleccionado se clonó en el plásmido pGEM-T easy y se generó el plásmido pMUS1165. Posteriormente, se digirió el plásmido pMUS1165 con las enzimas *EcoRI/BamHI*, que escinde el inserto de ~0,9 pb, que se clonó en el vector suicida en los rizobios pK18*mobsac* digerido con las mismas enzimas de restricción. De esta forma se generó el plásmido pMUS1192. Por último, este plásmido se homogenizó en la estirpe silvestre HH103 y de esta forma se obtuvo el mutante SVQ707 (= HH103 *nopI*Δ) (**Figura 51**).

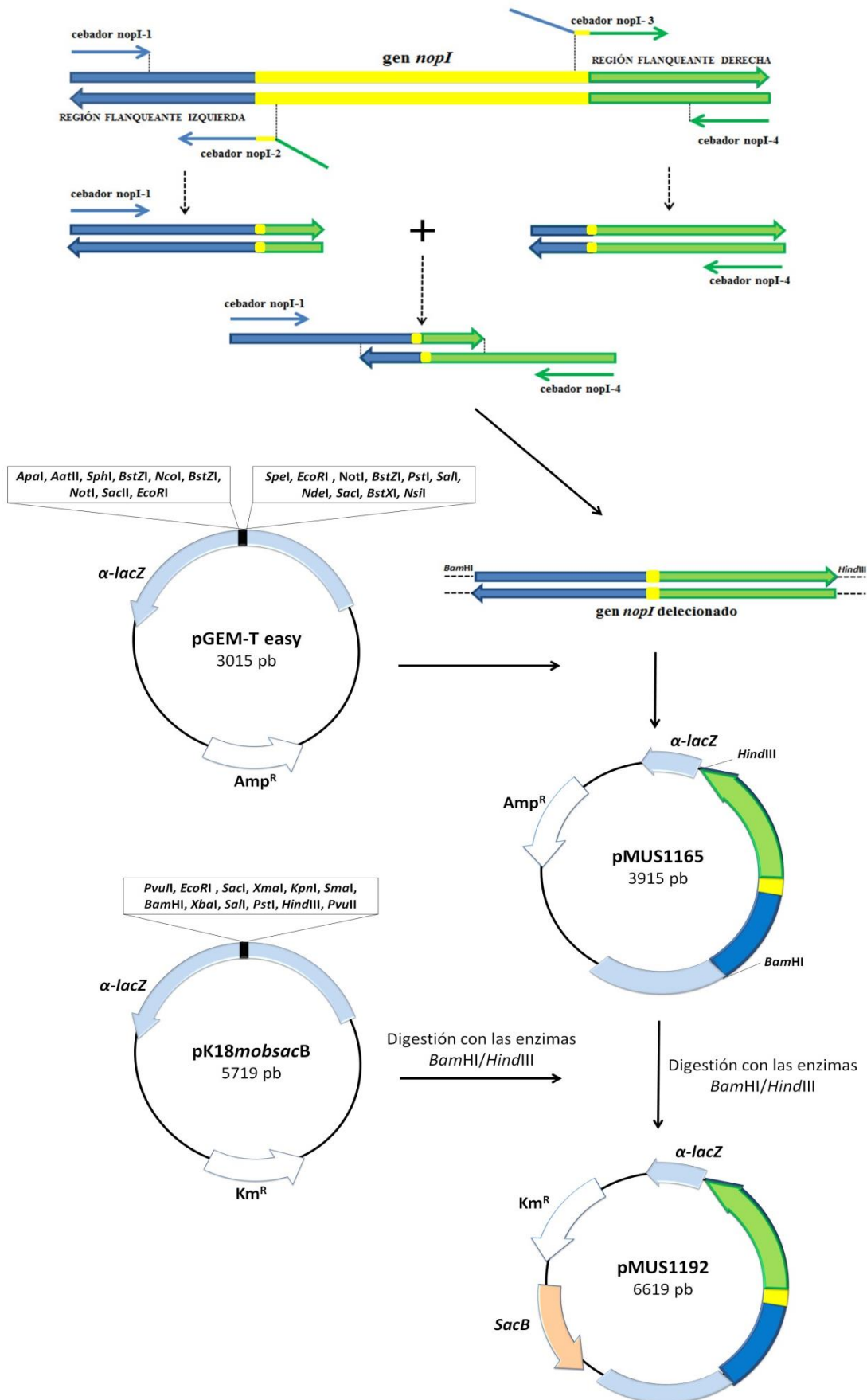


Figura 51. Construcción del mutante SVQ707 (= HH103 *nopI*Δ) por deleción mediante PCR solapante.

La homogenización de la mutación por delección se comprobó mediante PCR. Para ello, se utilizaron los cebadores *nopI-1* y *nopI-4* y como ADN molde el ADN total del mutante HH103 *nopI* Δ . Además, como control se incluyó el ADN total de la estirpe silvestre HH103, de manera que el amplicón que se generó a partir del mutante fue de ~0,9 kb y el de la estirpe silvestre de 1,67 kb (**Figura 52**). Por último, la delección en el gen *nopI*, se comprobó mediante secuenciación del gen en el mutante SVQ707 (datos nos mostrados).

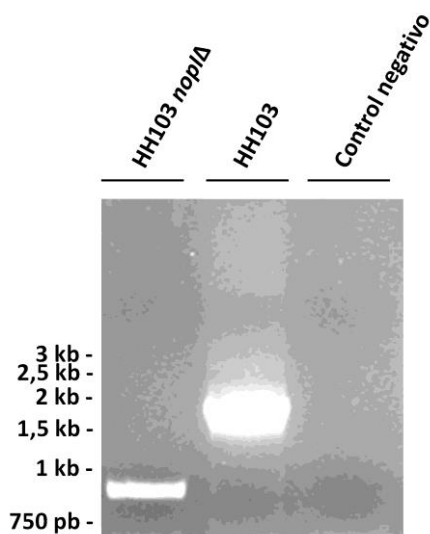


Figura 52. Comprobación del mutante HH103 *nopI* Δ mediante PCR. Los tamaños del marcador de 1 kb se muestran a la izquierda (iNtRON Biotechnology, Corea del Sur). El control negativo se realizó con todos los componentes de la PCR excepto el ADN molde.

La complementación de la mutación se realizó mediante la amplificación por PCR de un fragmento de ~1,7 kb con los cebadores *nopI-1* y *nopI-4*, usando el ADN genómico de HH103 como ADN molde. El amplicón, que contenía el gen *nopI* de HH103 e incluía la caja *tts* de su región promotora, se clonó en el plásmido pGEM-T easy generando el plásmido pMUS1127. Posteriormente, este plásmido se digirió con la enzima *EcoRI* y el fragmento liberado de ~1,7 kb, que contenía el gen *nopI*, se subclonó en el plásmido pMP92, previamente digerido con la misma enzima, generando el plásmido pMUS1215, que se conjugó con la estirpe mutante HH103 *nopI* Δ para generar la estirpe complementada HH103 *nopI* Δ (pMUS1215) (**Figura 53**).

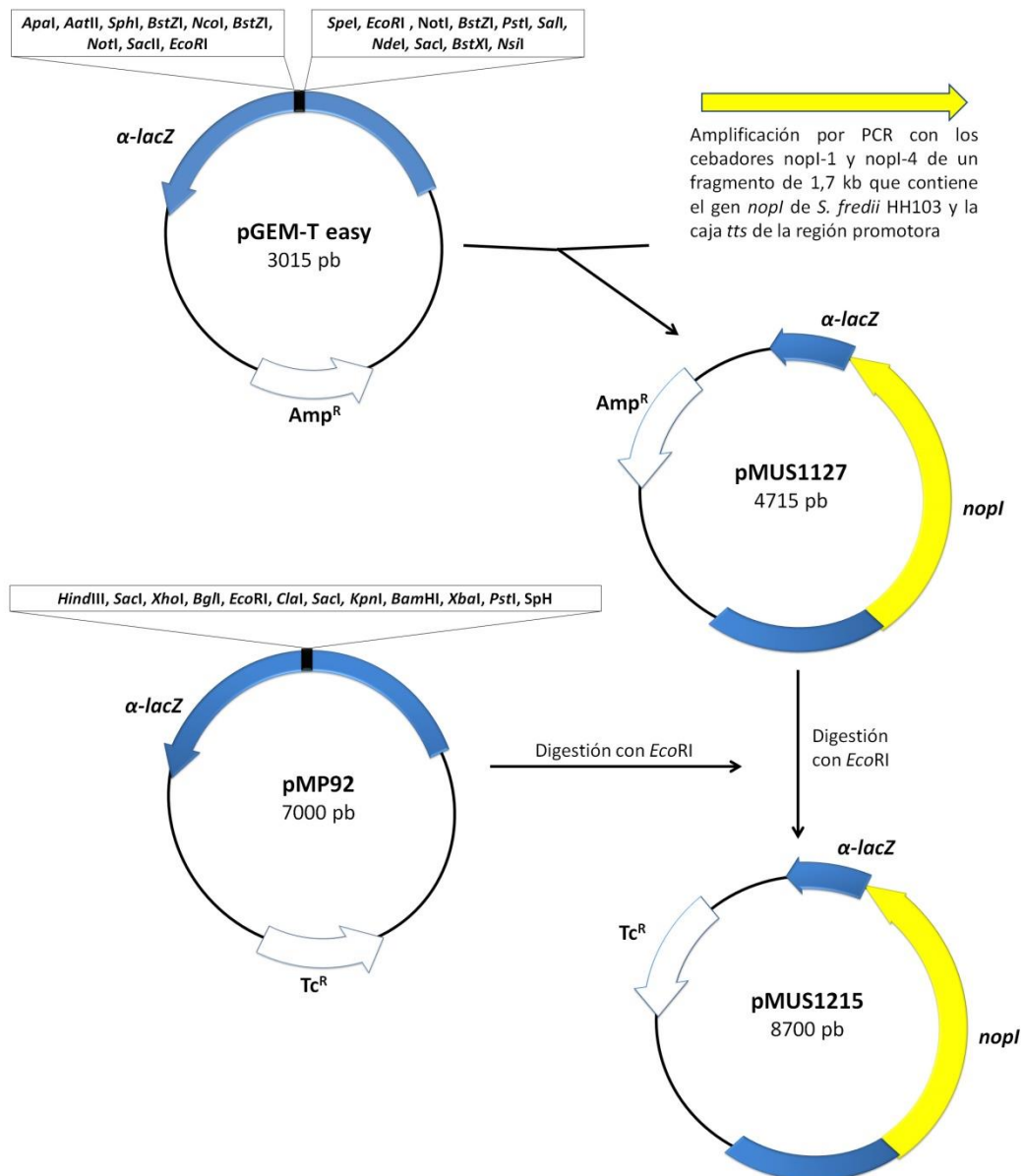


Figura 53. Esquema de la construcción del plásmido pMUS1215 para complementar la mutación de *nopI*.

2. 3. Estudio de la regulación de la expresión del gen *nopI*.

Como se comentó anteriormente, el análisis del genoma de HH103 permitió identificar un nuevo gen, *nopI*, que posee una caja *tts* en su región promotora (70 pb aguas arriba del gen). Por este motivo se realizaron ensayos de *qPCR* para determinar si la expresión del gen *nopI* se encuentra regulada por flavonoides y por la proteína NodD1 y para comprobar que su expresión depende del regulador transcripcional TtsI. Para ello se extrajo el ARN total de la estirpe parental HH103, del mutante HH103

nodD1::lacZ-Gm^R y del mutante HH103 *ttsI::Ω* y se midió la expresión del gen *nopI* a partir de cultivos de estas estirpes no inducidos e inducidos con genisteína a una concentración de 3,7 μ M. Los resultados obtenidos mostraron que el gen *nopI* solo se transcribió en el cultivo de la estirpe parental HH103 suplementado con genisteína (10 veces). No se observó activación de este gen en ninguna de las otras condiciones ensayadas, de modo que la activación del gen *nopI* depende de flavonoides, de la proteína reguladora NodD1 y del regulador transcripcional TtsI (**Figura 54**).

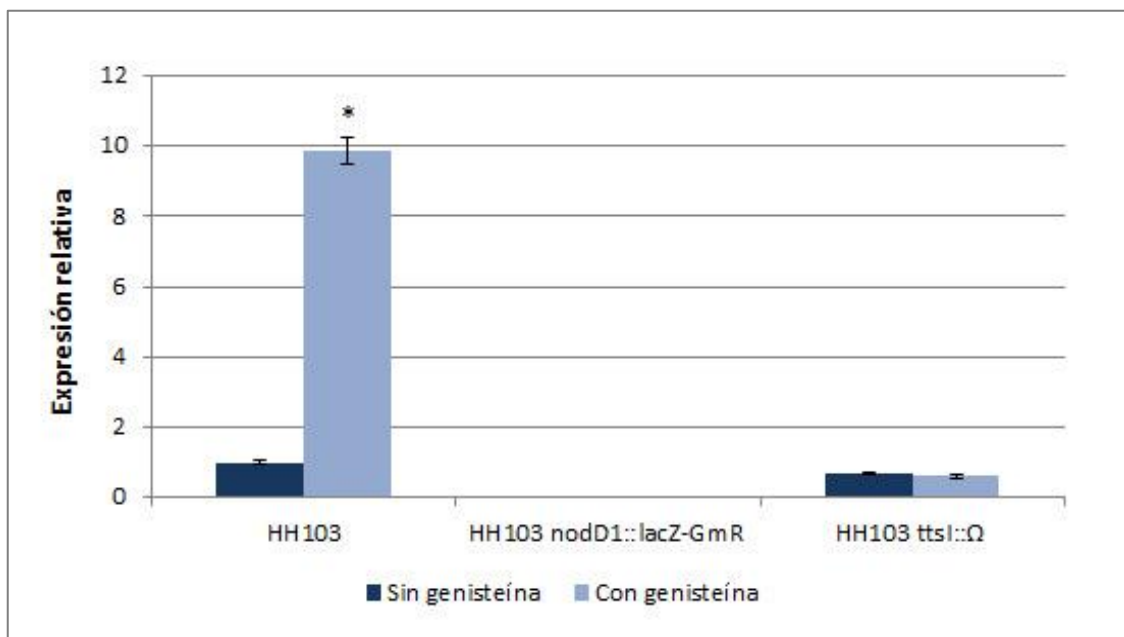


Figura 54. Análisis por *qPCR* de la expresión del gen *nopI* de HH103. El ADNc utilizado para este análisis proviene de cultivos de las estirpes HH103, HH103 *nodD1::lacZ-Gm^R* y HH103 *ttsI::Ω* crecidos en presencia o ausencia de genisteína a una concentración de 3,7 μ M. El gen *16S* se utilizó como control. Los datos representan las medias de 3 réplicas de 2 extracciones de ARN independientes. Cada tratamiento con genisteína se comparó individualmente con los datos obtenidos de las estirpes correspondientes sin genisteína usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

2. 4. Efecto de la mutación del gen *nopI* sobre la secreción de las proteínas Nop.

La proteína NopI no ha sido identificada en ningún estudio realizado hasta el momento. En el trabajo de **Rodrigues et al. (2007)** se secuenciaron las bandas correspondientes a las proteínas secretadas por HH103 inducidas con el flavonoide genisteína para identificar las posibles proteínas Nop de esta estirpe. Los autores

describieron la presencia de la proteína NopP en las bandas 5 y 6 del gel. Sin embargo, la comparación de la secuencia proteica de NopI frente a algunos péptidos secuenciados por **Rodrigues *et al.* (2007)** ha indicado que comparten cierta similitud entre sí. Así, uno de los péptidos secuenciados de la Banda 5 mediante el análisis LC-MALDI-MS/MS comparte con NopI un 68% de identidad, si bien se ha descrito como una secuencia proteica de NopP. Por esto, no es posible asegurar que la proteína NopI secrete al exterior celular en un cultivo de HH103 inducido con genisteína.

Se estudiaron y se compararon los perfiles de proteínas extracelulares del mutante HH103 *nopI* Δ tras la inducción con el flavonoide genisteína con los obtenidos con la estirpe parental HH103. Resultó muy complejo identificar la proteína NopI en el perfil de las proteínas extracelulares mediante la tinción con plata de un gel de poliacrilamida, por lo que solo se estudió si la mutación en el gen *nopI* impide la secreción del resto de proteínas Nop. Los resultados representados en la **Figura 55** indican que el mutante HH103 *nopI* Δ no afecta a la secreción del resto de proteínas Nop.

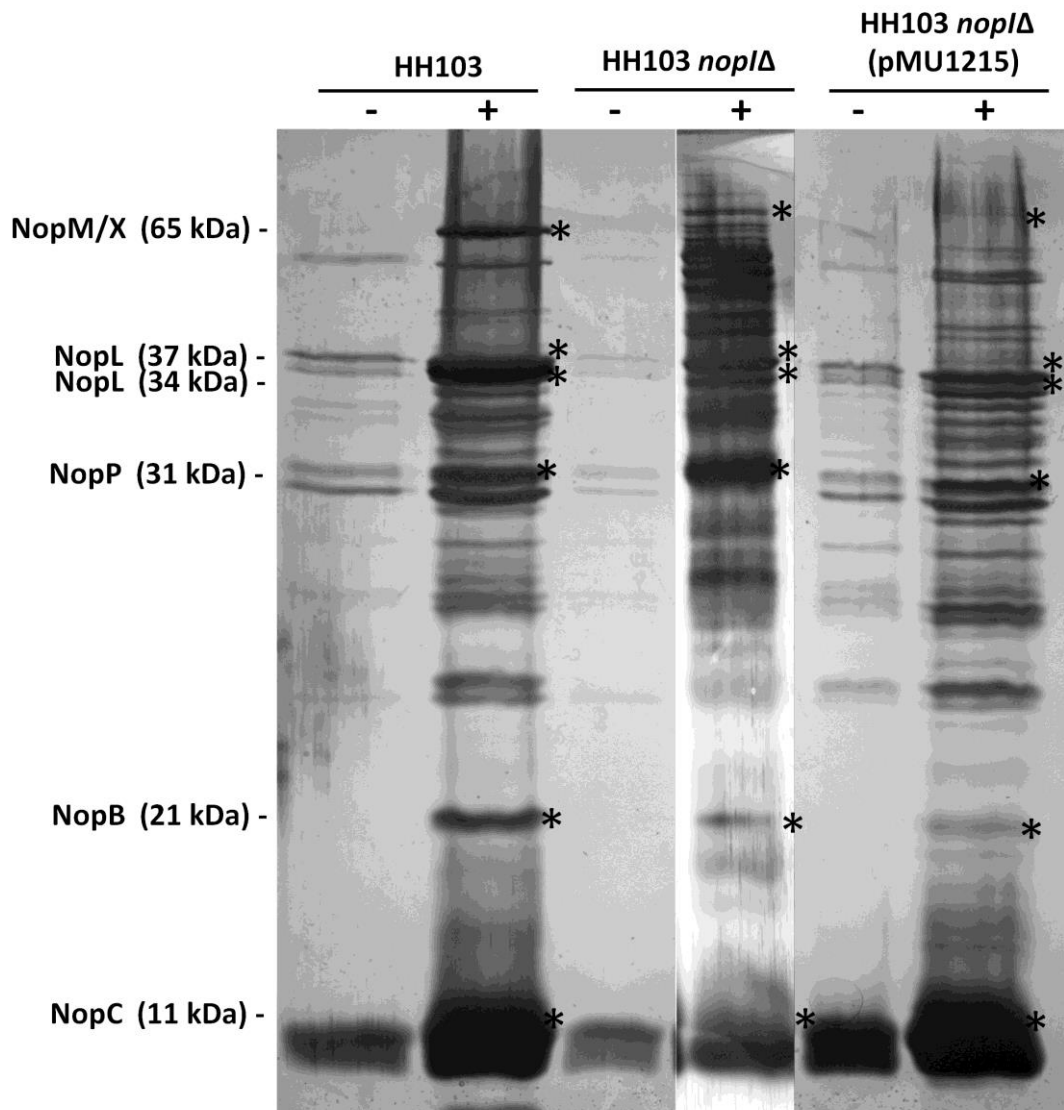


Figura 54. Perfil de las proteínas extracelulares procedentes de cultivos de las estirpes HH103, HH103 *nopI*Δ y HH103 *nopI*Δ (pMUS1215) crecidas en presencia (+) o ausencia (-) de genisteína a una concentración de 3,7 μ M. Las masas moleculares (kDa) del marcador (Bio-Rad, EEUU) se usaron para inferir las masas moleculares (indicadas a la izquierda) de las proteínas cuya secreción depende de genisteína, marcadas con un asterisco.

3. Fenotipo simbiótico de los mutantes en los genes *nopL*, *nopI* y *nopP* de *S. fredii* HH103.

Como los genes *nopL*, *nopI* y *nopP* son específicos de rizobios y comparten cierta homología respecto a sus secuencias (en el caso de *nopP* y *nopI*) o a la posible función que ejercen en la célula hospedadora (NopL y NopP son fosforilados por quinasas de la célula hospedadora y NopI posee un dominio similar al EPPIYE potencialmente fosforilable), se decidió realizar los test de nodulación incluyendo los mutante simples de los genes *nopP*, *nopI* y *nopL*, todas las combinaciones posibles de mutantes dobles y un mutante triple afectado en los tres genes.

Respecto a los mutante simples, se ensayaron los fenotipos simbióticos del mutante HH103 *nopP::lacZ-Gm^R* (López-Baena *et al.*, 2009) y aquellos obtenidos en esta Tesis afectados en el gen *nopL* (HH103 *nopL::Ω*) y en el gen *nopI* (HH103 *nopIΔ*).

Paralelamente, se ensayaron los dobles mutantes afectados en estos genes. La estirpe HH103 *nopP::lacZ-Gm^R-nopL::Ω* se generó a partir de la conjugación de la estirpe receptora HH103 *nopP::lacZ-Gm^R* con la estirpe donadora del plásmido pMUS1095. El mutante HH103 *nopIΔ-nopP::lacZ-Gm^R* se obtuvo a partir del fondo genético HH103 *nopIΔ* conjugado con la estirpe donadora del plásmido pMUS854 (López-Baena *et al.*, 2009). La estirpe HH103 *nopIΔ-nopL::Ω* deriva de la conjugación de la estirpe receptora HH103 *nopIΔ* conjugada con la donadora del plásmido pMUS1095. Por último, se incluyó el triple mutante afectado en estos tres genes. Para su construcción se utilizó el fondo genético HH103 *nopIΔ-nopP::lacZ-Gm^R* y se conjugó con la estirpe donadora del plásmido pMUS1095, dando lugar a la estirpe HH103 *nopIΔ-nopP::lacZ-Gm^R-nopL::Ω*.

La estirpe parental HH103 y el resto de los mutantes afectados en los genes *nopP*, *nopL* y *nopI*, fueron capaces de nodular soja Williams. Está descrito que la inoculación con el mutante HH103 *nopP::lacZ-Gm^R* induce la formación de un mayor número de nódulos en esta leguminosa (López-Baena *et al.*, 2009), por lo que el gen *nopP* parece tener un efecto negativo sobre la nodulación. Este mismo efecto se observó con el gen *nopL*, cuyo mutante HH103 *nopL::Ω* provocó un aumento significativo en la masa seca de la parte aérea (Tabla 14 y Figura 56), además de incrementarse el tamaño del nódulo (datos no mostrados). Sin embargo, el gen *nopI* parece tener un efecto positivo

en la nodulación con soja Williams, ya que la inoculación con el mutante HH103 *nopI* Δ provocó una reducción del número de nódulos (**Tabla 14**). Sin embargo, el tamaño de éstos fue significativamente mayor que el de la estirpe silvestre HH103.

El triple mutante y los dobles mutantes sufrieron una reducción significativa del número de nódulos. De todos ellos, solo el mutante HH103 *nopI* Δ -*nopP*::*lacZ*-Gm^R provocó una reducción significativa de la masa fresca de los nódulos y el mutante HH103 *nopP*::*lacZ*-Gm^R-*nopL*:: Ω una reducción significativa de la masa seca de la parte aérea de la planta (**Tabla 14 y Figura 56**). Curiosamente, todos los dobles mutantes y el triple en los que se encontraba afectado el gen *nopI* generaron un aumento significativo del tamaño de los nódulos respecto a los de la estirpe parental. De hecho, el doble mutante afectado en los genes *nopP* y *nopL* no presentó cambios en el tamaño de los nódulos (datos no mostrados).

La complementación del mutante en el gen *nopL* con el plásmido pMUS1911 incrementó significativamente el número de nódulos así como la masa seca de la parte aérea comparado con los parámetros obtenidos cuando se inoculó la estirpe parental (**Tabla 14**). Este hecho podría explicarse por la mayor expresión del gen, ya que para complementar la mutación se usó el vector pMP92, por lo que la carga génica puede ser mayor que la de la estirpe parental. Dependiendo de la interacción *Rhizobium*-leguminosa, los efectos sobre la planta podrían ser contrapuestos en función del nivel de expresión del efector. Por su parte, la complementación del gen *nopI* con el plásmido pMUS1215 no tuvo efecto, obteniéndose parámetros simbióticos similares a los detectados en el mutante en el gen (**Tabla 14**).

Tabla 14. Respuesta de *G. max* cv. Williams a la inoculación con las estirpes *S. fredii* HH103 y diversos mutantes relacionados con el T3SS, afectados en los genes *nopL*, *nopP* y *nopI*.

<i>G. max</i> cv. Williams			
Tratamiento	Número de nódulos	Masa fresca de los nódulos (g)	Masa seca de la parte aérea (g)
HH103	101,80± 22,30	0,54± 0,17	1,76± 0,49
HH103 <i>nopL</i> ::Ω	102,50± 3,79	0,66± 0,08	2,78± 0,43*
HH103 <i>nopL</i> ::Ω (pMUS1911)	145± 34,55**	0,76± 0,04	2,49± 0,30**
HH103 <i>nopI</i> Δ	52,50± 21,08*	0,50± 0,16	1,75± 0,34
HH103 <i>nopI</i> Δ (pMUS1215)	51,67± 12,06*	0,58± 0,18	1,89± 0,52
HH103 <i>nopP</i> :: <i>lacZ</i> -Gm ^R - <i>nopL</i> ::Ω	67,25±19,84**	0,41±0,14	1,15±0,45**
HH103 <i>nopI</i> Δ- <i>nopP</i> :: <i>lacZ</i> -Gm ^R	31,50± 7,94*	0,32± 0,09**	1,29± 0,46
HH103 <i>nopI</i> Δ- <i>nopL</i> ::Ω	43,80± 18,69*	0,50± 0,25	1,74± 0,80
HH103 <i>nopI</i> Δ- <i>nopP</i> :: <i>lacZ</i> -Gm ^R - <i>nopL</i> ::Ω	47,20± 15,67*	0,42± 0,17	1,22± 0,31
No inoculado	0± 0*	0± 0*	0,40± 0,07*

Los datos representan las medias de 12 plantas. Los valores se tomaron 6 semanas después de la inoculación o tratamiento. Las bacterias aisladas de 20 nódulos formados por cada inoculante mostraron los marcadores de resistencia esperados. Cada tratamiento se comparó individualmente con la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los números de la misma columna seguidos de un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$ y los seguidos de dos asteriscos son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 10\%$.

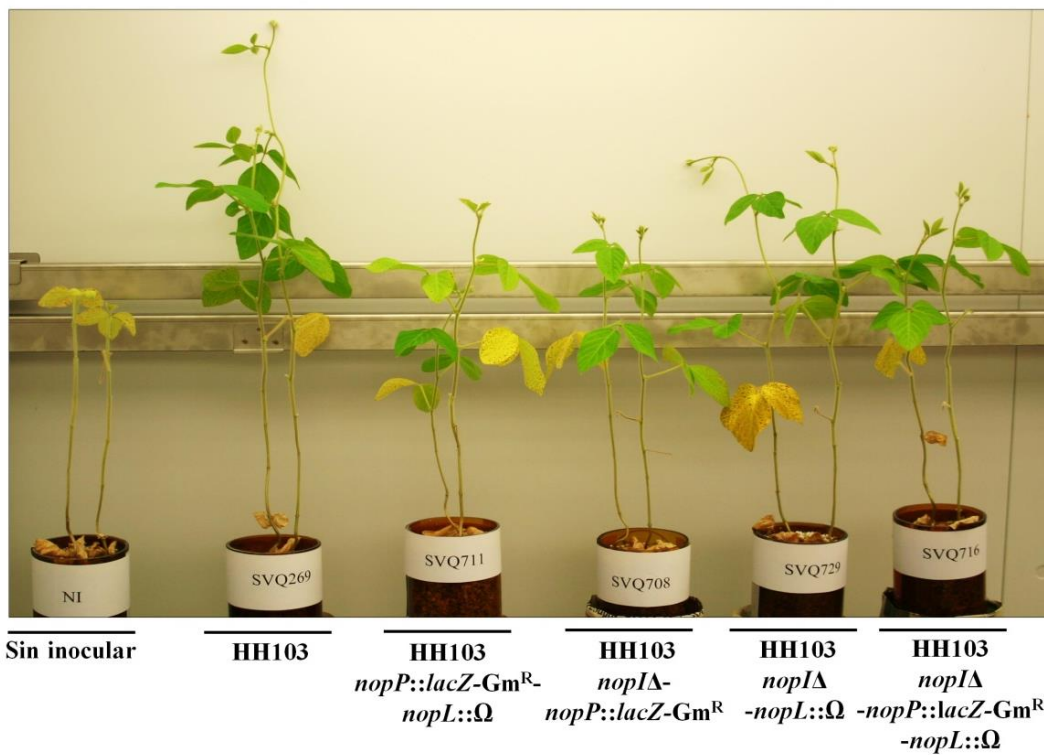
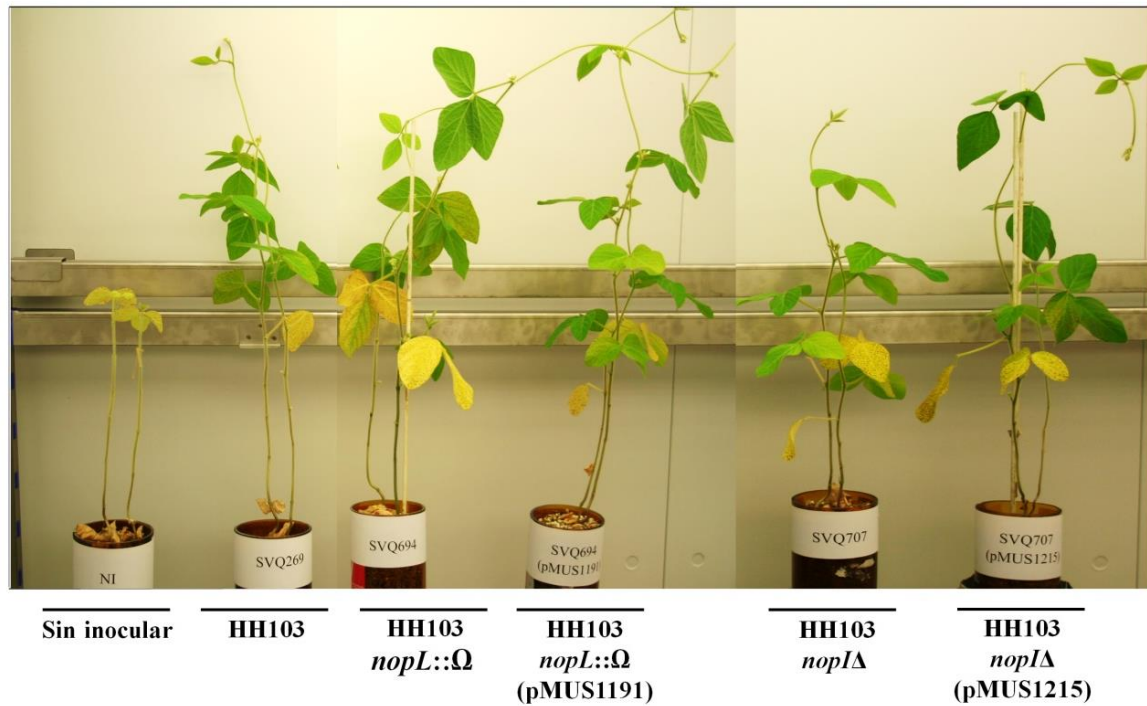


Figura 56. Aspecto de las plantas de soja Williams inoculadas con las estirpes *S. fredii* HH103 y diversos mutantes relacionados con el T3SS, afectados en los genes *nopL*, *nopP* y *nopI*.

La **Tabla 15** muestra que la capacidad de la estirpe parental HH103 para nodular *S. tomentosa* fue muy reducida, presentando solo un 20% de eficiencia en la nodulación. Las plantas de esta leguminosa inoculadas con los mutantes simples afectados en los genes *nopP*, *nopL* y *nopI* no fueron capaces de nodular en ningún caso, indicando que estos genes influyen positivamente en la nodulación de *S. fredii* HH103 con *S. tomentosa*. Las estirpes complementadas restauraron el fenotipo simbiótico, alcanzando los niveles de eficiencia similares a los de la estirpe silvestre HH103. Además, se observó que todos los dobles mutantes favorecieron la nodulación aumentando en la mayoría de los casos el número de nódulos. Así, las plantas inoculadas con las estirpes HH103 *nopP::lacZ-Gm^R-nopL::Ω* y HH103 *nopIΔ-nopL::Ω* presentaron una eficiencia en la nodulación similar a la observada para la estirpe silvestre. Sin embargo, la estirpe HH103 *nopIΔ-nopP::lacZ-Gm^R* promovió la nodulación de *S. tomentosa*, ya que se alcanzó una eficiencia en la nodulación del 50% frente al 20% observado cuando las plantas se inocularon con la estirpe silvestre. Sorprendentemente, ninguna planta inoculada con el triple mutante HH103 *nopIΔ-nopP::lacZ-Gm^R-nopL::Ω* desarrolló ningún nódulo. Estos resultados sugieren que el conjunto de las proteínas NopP, NopL y NopI se requieren para la nodulación. La mutación en uno solo de estos genes impide la nodulación. Sin embargo, la ausencia de dos de estas proteínas de forma simultánea, especialmente si una de ellas es NopI, repercute positivamente en la simbiosis de *S. fredii* HH103 con esta leguminosa, por lo que es probable que la función de cada una de las Nop dentro de la célula vegetal se encuentren muy relacionadas.

Tabla 15. Respuesta de plantas de *Sophora tomentosa* a la inoculación con las estirpes *S. fredii* HH103 y diversos mutantes relacionados con el T3SS afectados en los genes *nopL*, *nopP* y *nopI*.

<i>Sophora tomentosa</i>				
Tratamiento	Plantas noduladas	Media del número de nódulos	Plantas ensayadas	Eficiencia nodulación (%)
HH103	2	3	10	20
HH103 <i>nopP</i> :: <i>lacZ</i> - Gm ^R	0	0	10	0
HH103 <i>nopL</i> :: Ω	0	0	10	0
HH103 <i>nopL</i> :: Ω (pMUS1911)	2	1	10	20
HH103 <i>nopI</i> Δ	0	0	12	0
HH103 <i>nopI</i> Δ (pMUS1215)	2	0	8	25
HH103 <i>nopP</i> :: <i>lacZ</i> - Gm ^R - <i>nopL</i> :: Ω	2	1	12	17
HH103 <i>nopI</i> Δ - <i>nopP</i> :: <i>lacZ</i> -Gm ^R	4	3,5	8	50
HH103 <i>nopI</i> Δ - <i>nopL</i> :: Ω	2	7	10	20
HH103 <i>nopI</i> Δ - <i>nopP</i> :: <i>lacZ</i> -Gm ^R - <i>nopL</i> :: Ω	0	0	8	0
No inoculado	0	0	10	0

Se realizaron dos ensayos obteniéndose valores similares. Los datos representados corresponden a los valores de entre 4 y 6 plantas de uno de los ensayos. Los valores se tomaron 12 semanas después de la inoculación o tratamiento. La media del número de nódulos se calculó para las plantas que presentaron nódulos en cada uno de los tratamientos. Las bacterias aisladas de los nódulos formados por cada inoculante mostraron los marcadores de resistencia esperados.

La **Tabla 16 y la Figura 57** muestran que la estirpe parental HH103 posee la capacidad para nodular la leguminosa *Vigna unguiculata*, promoviendo la aparición de nódulos fijadores determinados y un gran desarrollo de la parte aérea. Por otro lado, el resto de las estirpes ensayadas también fueron capaces de nodular, aunque la mayoría de ellas presentaron cambios en sus fenotipos simbióticos. Así, las plantas inoculadas con el mutante simple afectado en el gen *nopL* presentaron un incremento del número de nódulos, aunque este aumento no fue significativo. Además, estas plantas sufrieron un aumento significativo del crecimiento de la parte aérea (**Tabla 16 y Figura 57**). La estirpe complementada no fue capaz de restaurar el fenotipo simbiótico al nivel de la estirpe silvestre HH103. Los resultados obtenidos mostraron que el aumento de las copias del gen *nopL* provocaba un efecto contrario al producido por la mutación del gen. De esta forma, mientras que la ausencia de la proteína NopL repercute de forma positiva sobre la nodulación en esta leguminosa, la sobreexpresión de esta proteína posee un efecto claramente negativo en la simbiosis de *S. fredii* HH103 y *V. unguiculata*.

La eficiencia de la nodulación del resto de los mutantes ensayados se vio significativamente reducida y, en la mayoría de los casos, todos los parámetros analizados (número de nódulos, masa fresca de los nódulos y masa seca aérea) se redujeron significativamente (**Tabla 16 y Figura 57**). La estirpe complementada de la mutación en el gen *nopI* no fue capaz de restaurar el fenotipo simbiótico a los niveles del silvestre. La complementación de la mutación se realizó mediante la clonación del gen *nopI* en el plásmido pMP92 y resulta imposible controlar tanto la dosis génica como la estabilidad del plásmido.

Tabla 16. Respuesta de plantas de *V. unguiculata* a la inoculación con las estirpes *S. fredii* HH103 y diversos mutantes relacionados con el T3SS, afectados en los genes *nopL*, *nopP* y *nopI*.

<i>Vigna unguiculata</i>			
Tratamiento	Número de nódulos	Masa fresca de los nódulos (g)	Masa seca de la parte aérea (g)
HH103	72 ± 4,58	1,2 ± 0,18	2,3 ± 0,13
HH103 <i>nopL</i> ::Ω	122,3 ± 63,45	1,3 ± 0,13	3 ± 0,58 *
HH103 <i>nopL</i> ::Ω (pMUS1911)	29,8 ± 16,78 *	0,5 ± 0,12 *	0,9 ± 0,21 *
HH103 <i>nopI</i> Δ	30 ± 9,85 *	0,6 ± 0,22 *	0,8 ± 0,4 *
HH103 <i>nopI</i> Δ (pMUS1215)	31,1 ± 11,4 *	0,5 ± 0,21 *	0,8 ± 0,35 *
HH103 <i>nopP</i> :: <i>lacZ</i> -Gm ^R - <i>nopL</i> ::Ω	31,3 ± 3,79 *	0,5 ± 0,14 *	0,9 ± 0,24 *
HH103 <i>nopI</i> Δ- <i>nopP</i> :: <i>lacZ</i> - Gm ^R	23,4 ± 13,56 *	0,8 ± 0,43	1,4 ± 0,55 *
HH103 <i>nopI</i> Δ- <i>nopL</i> ::Ω	24,5 ± 2,6 *	0,6 ± 0,46 **	0,9 ± 0,92 *
HH103 <i>nopI</i> Δ- <i>nopP</i> :: <i>lacZ</i> - Gm ^R - <i>nopL</i> ::Ω	22,5 ± 6,61 *	0,6 ± 0,19 *	1,0 ± 0,44 *
No inoculado	0 ± 0 *	0 ± 0 *	0,2 ± 0,07 *

Los datos representan las medias de 12 plantas. Los valores se tomaron 6 semanas después de la inoculación o tratamiento. Las bacterias aisladas de 20 nódulos formados por cada inoculante mostraron los marcadores de resistencia esperados. Cada tratamiento se comparó individualmente con la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los números de la misma columna seguidos de un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$ y los seguidos de dos asteriscos son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 10\%$.

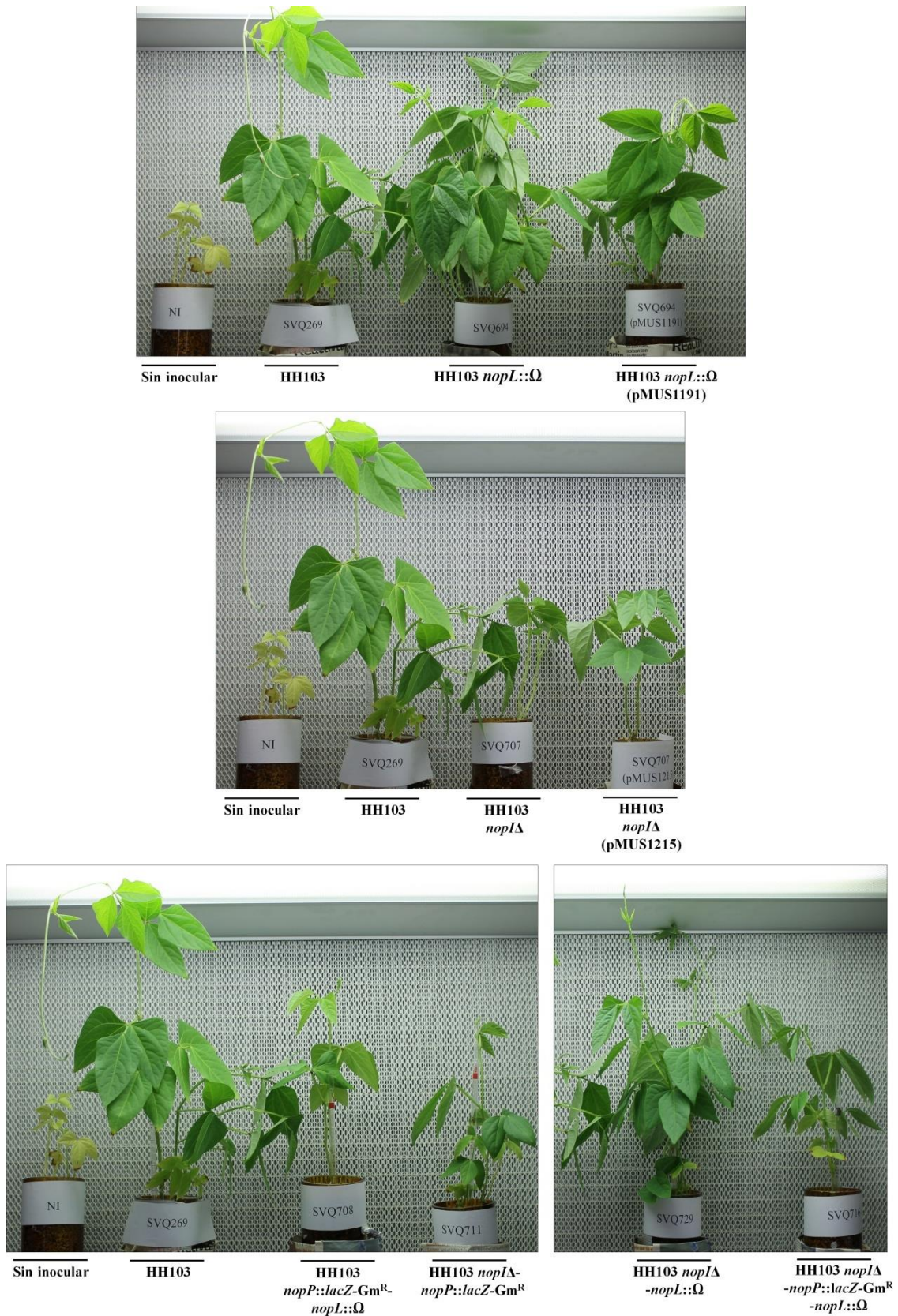


Figura 57. Aspecto de la parte aérea de plantas de *V. unguiculata* inoculadas con las estirpes *S. fredii* HH103 y diversos mutantes relacionados con el T3SS, afectados en los genes *nopL*, *nopP* y *nopI*.

A partir de los resultados obtenidos en este apartado se pueden destacar las siguientes conclusiones:

Los genes *nopI* y *nopL* de *S. fredii* HH103 se encuentran regulados por flavonoides, NodD1 y TtsI. La mutación en estos genes no afecta a la secreción del resto de Nop.

NopL es translocada al interior de la célula eucariota. La presencia de la proteína NopL afecta de forma negativa a la simbiosis de HH103 con leguminosas que forman nódulos determinados y de forma positiva a la simbiosis entre HH103 y *S. tomentosa*, planta que presenta nódulos indeterminados.

Por otro lado, la proteína NopI actúa de forma positiva en todas las relaciones simbióticas entre HH103 y las leguminosas ensayadas.

La presencia de la proteína NopP afecta de forma negativa en la simbiosis de esta estirpe con soja Williams, mientras que actúa de forma positiva en la simbiosis con *S. tomentosa* y *V. unguiculata*.

4. Caracterización del gen *nopC* de *S. fredii* HH103.

4. 1. Análisis de las secuencias del gen *nopC* y de la proteína NopC de *S. fredii* HH103.

La organización y posición del gen *nopC* de *S. fredii* HH103 en la región génica del T3SS es similar a la de la estirpe *S. fredii* NGR234 (Deakin *et al.*, 2005). El gen *nopC* se encuentra localizado aguas arriba del gen *nopA*, conformando ambos genes un operón situado en el plásmido simbiótico (pSfHH103) de *S. fredii* HH103 junto con la ORF y4yQ, cuya función se desconoce. La caja *tts* de este operón está localizada 71 pb aguas arriba del gen *nopC*.

El análisis de la comparación de la secuencia del gen *nopC* de *S. fredii* HH103 (AY775562) frente al resto de los rizobios reveló que este gen comparte un 99%, 100% y un 75% de identidad con los genes *nopC* de *S. fredii* NGR234 (U00090), *S. fredii* USDA257 (CP003565) y *M. loti* MAFF303099 (BA000012), respectivamente. Además,

este gen es específico de los rizobios ya que no comparte similitud con otros genes del resto de los microorganismos. El análisis de la comparación entre las secuencias proteicas de NopC de estos rizobios mostró que la proteína NopC de *S. fredii* HH103 (98 aa, AAY33494) tiene un 100% de identidad con las de las estirpes *S. fredii* NGR234 (98 aa, YP_052972), *S. fredii* USDA257 (98 aa, no está anotada) y un 51% de identidad con la proteína NopC de *M. loti* MAFF303099 (114 aa, no anotada) (**Figura 58**).

HH103	1	MVGVI GSGVGSIGVSLARKGGHGHSTGQPPRDSGGPSG-----HNRPDRGSG
NGR234	1	MVGVI GSGVGSIGVSLARKGGHGHSTGQPPRDSGGPSG-----HNRPDRGSG
USDA257	1	MVGVI GSGVGSIGVSLARKGGHGHSTGQPPRDSGGPSG-----HNRPDRGSG
MAFF303099	1	MAFAI GSGFGNI--SLARRG-HGDPKSOPEQPKPGSGNDDPNKPGSGNNDPNKPVGCKD
HH103	48	VTDGPTISGDRSQAAIQSEAFELALRSVALQLMNDAMADADEAMAETEEDA-----
NGR234	48	VTDGPTISGDRSQAAIQSEAFELALRSVALQLMNDAMADADEAMAETEEDA-----
USDA257	48	VTDGPTISGDRSQAAIQSEAFELALRSVALQLMNDAMADADEAMAETEEDAGWPPSGGACR
MAFF303099	58	PVDGQ TISGDDQQLA--EAFDTVILHSVALTIINDAMADADEAIAETEEDA-----
HH103	(98)	
NGR234	(98)	
USDA257	(110)	
MAFF303099	(106)	

Figura 58. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína NopC de *S. fredii* HH103 con las correspondientes proteínas homólogas de *S. fredii* NGR234, *S. fredii* USDA257 y *Mesorhizobium loti* MAFF303099. En negro se muestran los residuos idénticos entre las diferentes secuencias de aminoácidos y en gris los residuos similares.

4. 2. Construcción de un mutante en el gen *nopC* de *S. fredii* HH103.

La construcción del mutante en el gen *nopC* se realizó mediante el método de delección por PCR solapante. Para ello se diseñaron cuatro cebadores

- **nopC-1:** secuencia homóloga situada aguas arriba del gen *nopC* que contiene la diana para la enzima restricción *Bam*HI.

- **nopC-2:** secuencia complementaria a una zona localizada en el comienzo de *nopC*.

- **nopC-3**: secuencia homóloga situada al final del gen *nopC*.
- **nopC-4**: secuencia complementaria a una zona situada aguas abajo del gen *nopC* que porta la diana de restricción para la enzima *HindIII*.

En primer lugar, se realizó una PCR utilizando como ADN molde el ADN total de *S. fredii* HH103 y los cebadores *nopC-1* y *nopC-2* para amplificar un fragmento de 665 pb. A continuación, se realizó una segunda PCR con el ADN total de *S. fredii* HH103 y los cebadores *nopC-3* y *nopC-4* amplificando un fragmento de 439 pb. Por último, en la tercera PCR se utilizó como ADN molde los dos fragmentos anteriormente obtenidos y los cebadores *nopC-1* y *nopC-4*. De esta forma se amplificó un fragmento de ~1,1 kb en el que el gen *nopC* presentaba una deleción de 246 pb. En el caso del gen *nopC* fue importante deleccionar una secuencia múltiplo de 3 para generar una mutación apolar del gen *nopC* y de esta forma no afectar la transcripción de los genes que se encuentran aguas debajo en el operón.

Posteriormente, el fragmento deleccionado se secuenció y, una vez que se comprobó que presentaba la deleción no polar esperada, se clonó en el plásmido pGEM-T easy generando el plásmido pMUS1163, que se digirió con las enzimas *EcoRI/BamHI* y el inserto de ~1,1 kb se clonó en el plásmido pK18*mobsac* digerido con las mismas enzimas de restricción. De esta forma se generó el plásmido pMUS1192. Por último, este plásmido se conjugó utilizando como estirpe receptora para la homogenización la estirpe HH103 y de esta forma se obtuvo el mutante SVQ715 (= HH103 *nopC*Δ) (esquema similar al mostrado en la **Figura 51**).

La homogenización de la mutación por deleción se comprobó mediante PCR. Para ello, se utilizaron los cebadores *nopC-1* y *nopC-4* y como ADN molde el ADN total del mutante HH103 *nopC*Δ. Además, como control se incluyó el ADN total de la estirpe silvestre HH103, de manera que el amplicón que se generó a partir del mutante fue de ~1,1 kb y el de la estirpe silvestre de 1,35 kb (**Figura 59**). Por último, la deleción en el gen *nopC*, se comprobó mediante secuenciación del gen en el mutante SVQ715 (datos nos mostrados).

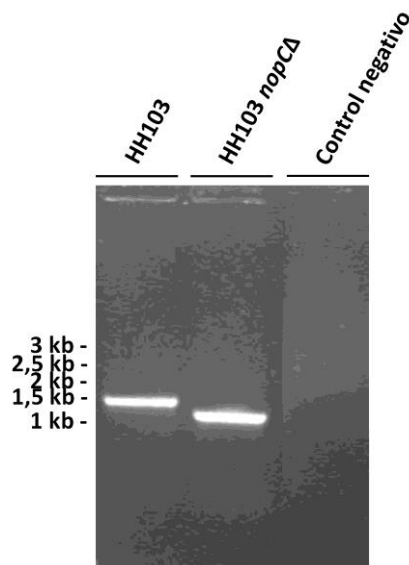


Figura 59. Comprobación del mutante HH103 *nopC*Δ mediante PCR. Los tamaños del marcador de 1 kb se muestran a la izquierda (iNtRON Biotechnology, Corea del Sur). El control negativo se realizó con todos los componentes de la PCR excepto el ADN molde.

La complementación de la mutación del gen *nopC* se llevó a cabo mediante la conjugación triparental de la estirpe receptora HH103 *nopC*Δ con el plásmido pMUS986 (López-Baena, 2008). El plásmido pMUS986 porta los genes *nopC* y *nopA* de *S. fredii* HH103 y la caja *tts* de la región promotora de este operón.

4. 3. Estudio de la regulación de la expresión del gen *nopC*.

Estudios previos sobre NopC de *S. fredii* NGR234 y HH103 han demostrado la presencia de esta proteína en el sobrenadante de los cultivos de estas estirpes a los que se les añadieron los flavonoides inductores (Deakin *et al.*, 2005; Lopez-Baena *et al.*, 2008). Además, se ha estudiado la presencia de NopC en los sobrenadantes de cultivos no inducidos e inducidos con genisteína (3,7 μM) de la estirpe parental HH103 y un mutante HH103 *ttsI*::Ω, afectado en la secreción de proteínas Nop. Mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-NopC específico para esta proteína de la estirpe *S. fredii* NGR234 (cedido por el Dr. Deakin, del LBMPS. Universidad de Ginebra) se comprobó que únicamente existía señal en el sobrenadante del cultivo de la estirpe silvestre HH103 inducido con genisteína (Lopez-Baena *et al.*, 2008). Estos resultados

parecen indicar que la secreción de la proteína NopC es dependiente de flavonoides y del T3SS.

En base a estos estudios, se realizaron ensayos de *qPCR* para determinar si la expresión del gen *nopC* de *S. fredii* HH103 está regulada por flavonoides, por la proteína NodD1 y por el regulador transcripcional TtsI. Para ello, se extrajo el ARN total de la estirpe parental HH103, del mutante HH103 *nodD1::lacZ-Gm^R* y del mutante HH103 *ttsI::Ω*, y se midió la expresión del gen *nopC* a partir de cultivos de estas estirpes no inducidos e inducidos con genisteína a una concentración de 3,7 μM . Los resultados obtenidos mostraron que el gen *nopC* solo se transcribió en el cultivo de la estirpe parental HH103 suplementado con genisteína 45 veces más que en el cultivo correspondiente sin el flavonoide. No se observó activación de este gen en ninguna de las otras estirpes en presencia de genisteína, de modo que la activación del gen *nopC* depende de flavonoides, de la proteína reguladora NodD1 y del regulador transcripcional TtsI (**Figura 60**).

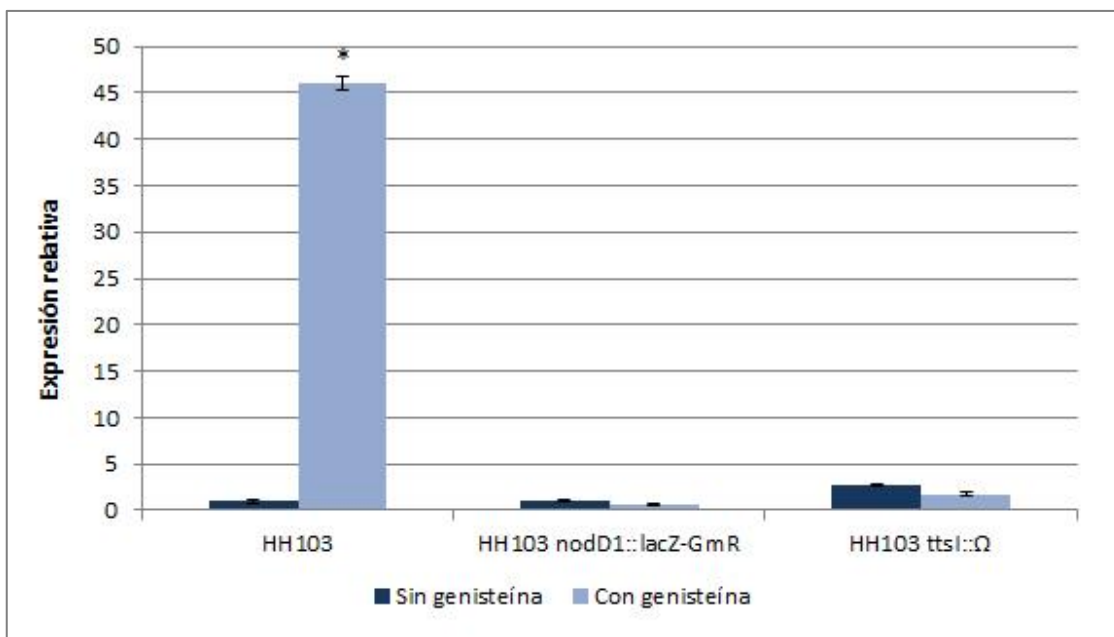
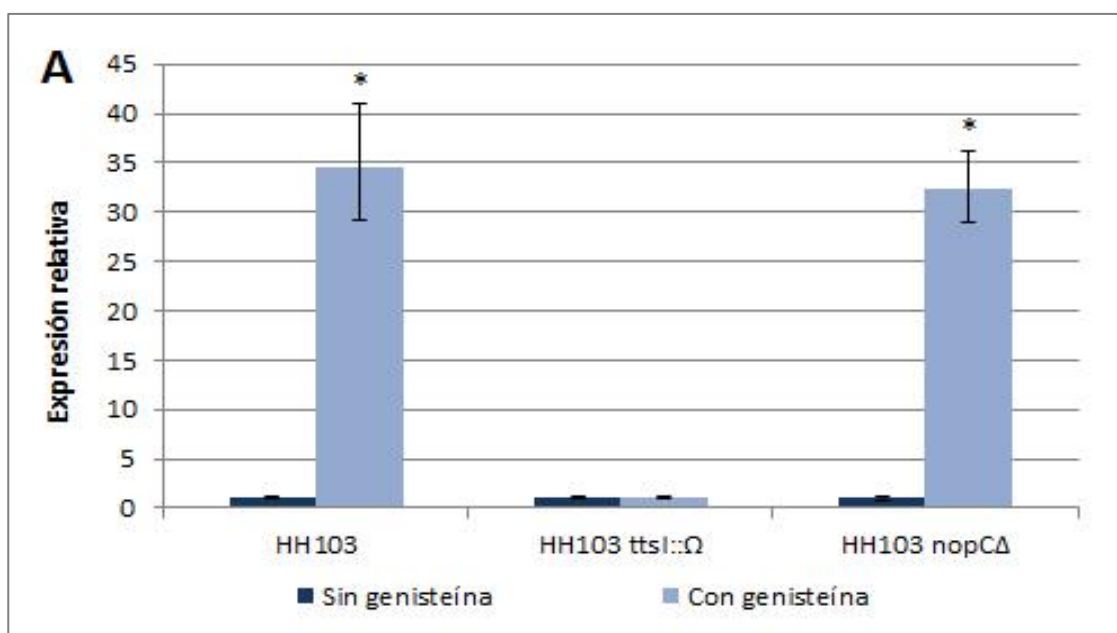


Figura 60. Análisis por *qPCR* de la expresión del gen *nopC* de *S. fredii* HH103. El ADNc utilizado para este análisis proviene de cultivos de las estirpes HH103, HH103 *nodD1::lacZ-Gm^R* y HH103 *ttsI::Ω* crecidos en presencia o ausencia de genisteína a una concentración de 3,7 μM . El gen *16S* se utilizó como control. Los datos representan las medias de 3 réplicas de 2 extracciones de ARN independientes. Cada tratamiento con genisteína se comparó individualmente con los datos obtenidos con la estirpe correspondiente sin genisteína usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

El mutante en el gen *nopC* se realizó para obtener una mutación no polar, es decir, para que no quedase afectada la transcripción del gen *nopA* que se encuentra aguas abajo del gen *nopC* en el operón que ambos conforman. Para comprobar que, efectivamente, esto ocurría, se estudió mediante *qPCR* la expresión del gen *nopA* en el fondo genético HH103 *nopC* Δ . Se incluyeron como controles las estirpes HH103 y HH103 *ttsI*:: Ω . Todas estas bacterias fueron crecidas en cultivos no inducidos e inducidos con genisteína a una concentración de 3,7 μ M. Además, se midió la expresión del gen *nodA* para validar los experimentos. Los resultados mostraron que en el cultivo del mutante HH103 *nopC* Δ inducido con genisteína se expresó gen *nopA*, por lo que se deduce que la delección del gen *nopC* de este mutante es no polar (**Figura 61, A**). Además, los controles incluidos en los experimentos muestran que, al igual que ocurre con *nopC*, la activación del gen *nopA* se induce con flavonoides, ya que solo se expresa el gen en la estirpe parental HH103 inducida con genisteína, y que depende del regulador transcripcional TtsI, ya que este gen no se expresa en los cultivos del mutante HH103 *ttsI*:: Ω , independientemente de la inducción con genisteína. Como era de esperar, en todos los casos se expresó el gen *nodA*, que como se ha descrito depende de flavonoides y del gen *nodD1* (**Figura 61, B**).



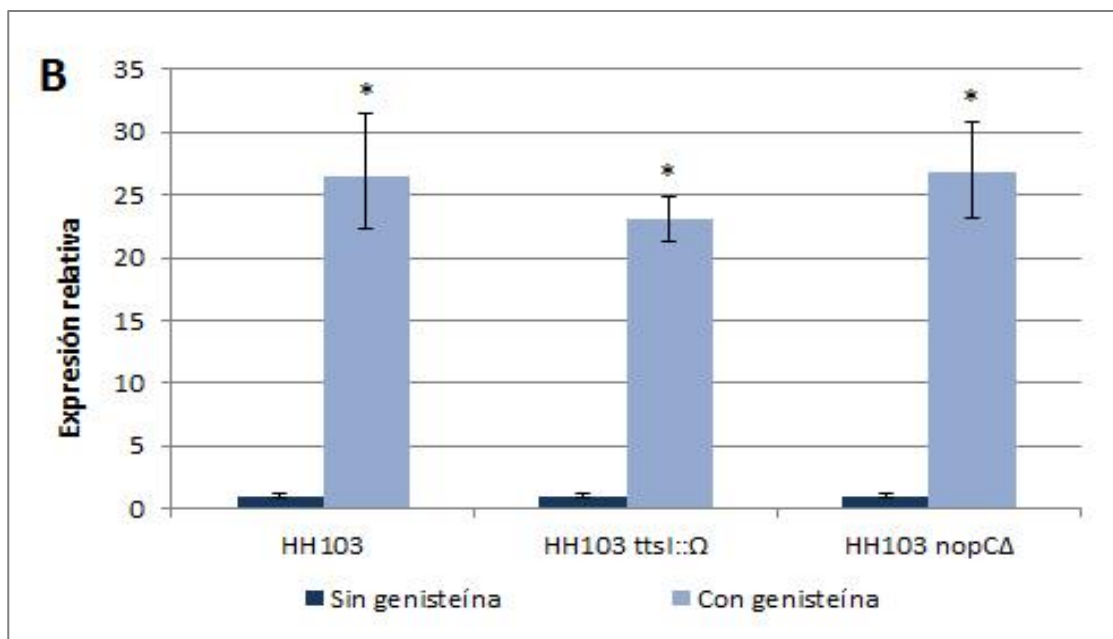


Figura 61. Análisis por *qPCR* de la expresión de los genes *nopA* (A) y *nodA* (B) de *S. fredii* HH103. El ADNc utilizado para este análisis proviene de cultivos de las estirpes HH103, HH103 *ttsI::Ω* y HH103 *nopCΔ* crecidos en presencia o ausencia de genisteína a una concentración de 3,7 μ M. El gen *16S* se utilizó como control. Los datos representan las medias de 3 réplicas de 2 extracciones de ARN independientes. Cada tratamiento se comparó individualmente con los datos obtenidos con la estirpe silvestre sin genisteína usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

4. 4. Efecto de la mutación del gen *nopC* sobre la secreción de las proteínas Nop.

Se estudiaron los perfiles de proteínas extracelulares del mutante HH103 *nopCΔ* tras la inducción con el flavonoide genisteína y se compararon con los obtenidos con la estirpe parental HH103. Los resultados indican que el mutante sólo deja de secretar la proteína NopC (Figura 62, A) sin afectar a la secreción del resto de proteínas Nop del T3SS. Los resultados observados en los gels de proteínas se confirmaron mediante el uso del anticuerpo específico anti-NopC y anti-NopX de *S. fredii* NGR234 (cedidos por el Dr. Deakin del LBMPs. Universidad de Ginebra) (Figura 62, B).

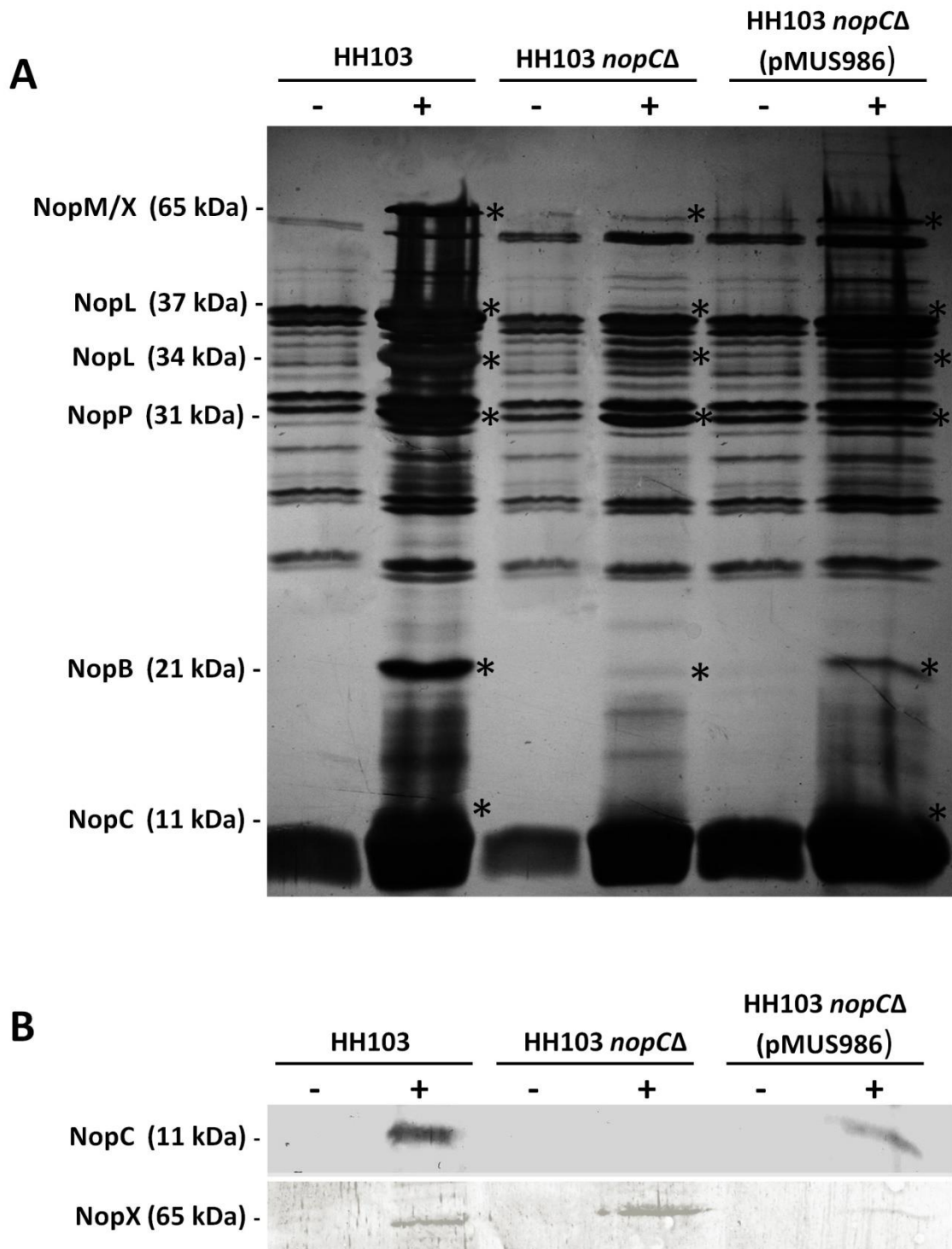


Figura 62. **A**, perfil de las proteínas extracelulares. **B**, inmunodetección de la proteína NopC. En ambos casos las proteínas proceden de cultivos de las estirpes HH103, HH103 *nopCA* y HH103 *nopCA* (pMUS986) crecidas en presencia (+) o ausencia (-) de genisteína a una concentración de 3,7 μ M. Las masas moleculares (kDa) del marcador (Bio-Rad, EEUU) están indicadas a la izquierda junto con las proteínas cuya secreción depende de genisteína, marcadas con un asterisco.

En la **Figura 62, B** se observa la aparición de la señal de detección de las proteínas NopC y NopX en los carriles correspondientes a los cultivos inducidos con genisteína de HH103 y de la estirpe usada para complementar la mutación HH103 *nopC* Δ (pMUS986) y no en los carriles correspondientes a estos cultivos no inducidos. En cambio, no se detectó la proteína NopC en el sobrenadante proveniente del cultivo del mutante HH103 *nopC* Δ no inducido o inducido con genisteína, pero sí se obtuvo señal de detección para la proteína NopX. Estos resultados indican que NopC es secretado al exterior celular sin conformar parte del *pilus* del T3SS (**Figura 62, A y B**).

4. 5. NopC es translocado al interior de la célula de la raíz de soja.

La confirmación de la translocación de NopC al interior de la célula eucariota se llevó a cabo mediante la técnica descrita en el apartado **1. 5. del Bloque I de Resultados**. Para ello se amplificó el gen *nopC* mediante PCR usando los cebadores *nopCattB1* y *nopCattB2sinstop* y como ADN molde el ADN total de la estirpe HH103. El amplicón de ~0,3 kb, correspondiente al gen *nopC* sin codón de stop, se clonó en el plásmido pDONR207, dando lugar a pMUS1239. Finalmente, el gen *nopC* se clonó en pLMS150 generando la construcción pMUS1290, que porta el gen *nopC* en fase con el gen reportero *cya*. Los sucesivos pasos de clonación se realizaron mediante el sistema Gateway (Invitrogen). Seguidamente, se realizó una PCR usando como ADN molde el ADN plasmídico de pMUS1290 y los cebadores *nopC_EcoRI* y *cya_BamHI*, que amplificaron un fragmento de ~1,5 kb que contenía la fusión *nopC-cya* y las dianas de restricción *EcoRI* y *HindIII* en los extremos, respectivamente. El amplicón y el plásmido pK18*mob* se digirieron con las enzimas *EcoRI/HindIII* y ambos fragmentos se ligaron para dar lugar a al plásmido pMUS1291 (para la construcción de este plásmido se llevó a cabo un esquema similar al mostrado en la **Figura 47**). Por último, la fusión *nopC-cya* se integró en el genoma de HH103 mediante conjugación y recombinación simple usando como estirpes receptoras HH103 y HH103 *ttsI:: Ω* . Posteriormente, las estirpes HH103, HH103 (*nopC-cya*) y HH103 *ttsI:: Ω* (*nopC-cya*) se inocularon en la raíz de soja Williams. A los 18 d.p.i. se recogió el primer tercio de la raíz y se cuantificó la concentración de AMPc que indica la existencia de actividad adenilato ciclasa del interior de la célula eucariota. Los resultados obtenidos demostraron que NopC de HH103 es un efector, ya que es translocado al interior de la célula de la raíz de soja

Williams (**Figura 63**). Así, las raíces inoculadas con la estirpe HH103 (*nopC-cya*) mostraron una alta concentración de AMPc, indicando que la proteína de fusión NopC-Cya se encontraba en el interior de la célula vegetal, produciendo AMPc a partir de ATP mediante el enzima Cya de *B. pertusis*. Como control se incluyeron las estirpes HH103 y HH103 *ttsI::Ω* (*nopC-cya*), de modo que las raíces inoculadas con ambas estirpes debían contener una concentración muy baja de AMPc, únicamente originado por la actividad basal de la adenilato ciclasa propia de la célula vegetal.

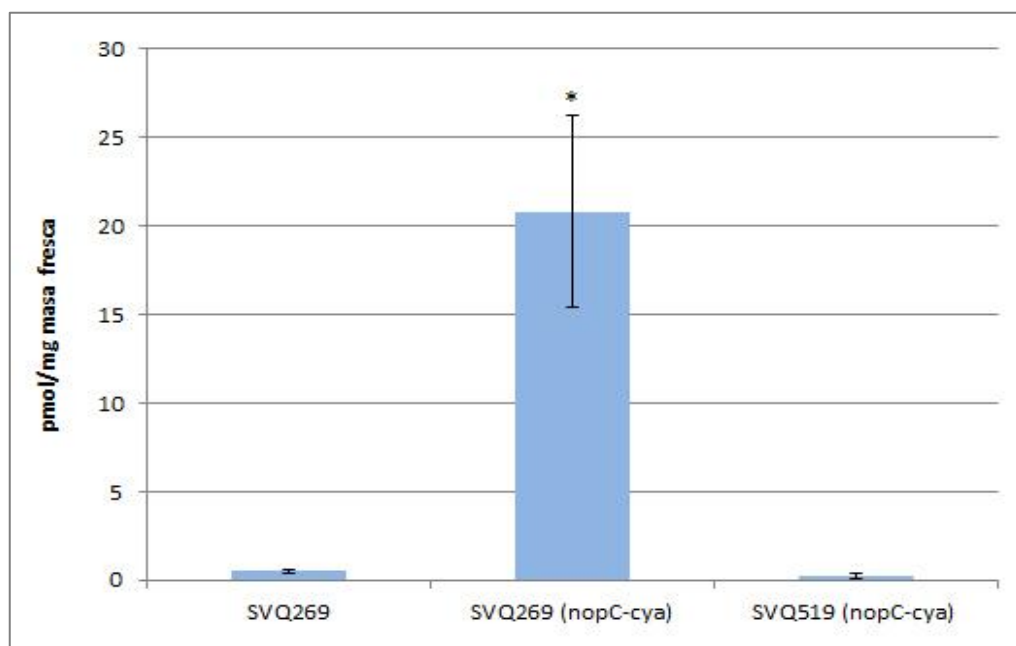


Figura 63. Cuantificación de AMPc de la raíz de soja Williams inoculada con las estirpes HH103, HH103 (*nopC-cya*) y HH103 *ttsI::Ω* (*nopC-cya*). Los datos representan la media de 3 réplicas de 2 ensayos independientes. Cada tratamiento se comparó individualmente con los datos obtenidos con la estirpe silvestre HH103 usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

4. 6. Fenotipo simbiótico del mutante en el gen *nopC*.

4. 6. 1. El gen *nopC* de *S. fredii* HH103 posee un efecto positivo en la nodulación con soja Williams.

Con el objeto de estudiar el papel que ejerce NopC sobre la simbiosis entre *S. fredii* HH103 y la soja se realizaron ensayos de nodulación incluyendo la estirpe parental

HH103 y el mutante delecionado HH103 *nopC*Δ. Ambas estirpes indujeron nódulos fijadores de nitrógeno en soja. Sin embargo, el número de nódulos y la masa fresca de éstos fueron significativamente menores en el caso del mutante HH103 *nopC*Δ con respecto a los mismos parámetros simbióticos inducidos por la estirpe parental (a un nivel de significación del 0,05% y del 0,10%, respectivamente). Además, aunque la masa seca de la parte aérea de las plantas inoculadas con el mutante HH103 *nopC*Δ tendía a disminuir con respecto al que presentaba las plantas inoculadas con la estirpe parental HH103, las diferencias no fueron significativas (**Tabla 17**). Sin embargo, el aspecto de la parte aérea de las plantas inoculadas con el mutante fue peor que el que presentaban las plantas inoculadas con la estirpe parental (**Figura 64**). Los resultados sugieren que NopC juega un papel importante en la simbiosis de *S. fredii* HH103 con soja Williams, actuando positivamente sobre la formación de los nódulos.

Tabla 17. Respuesta de soja Williams a la inoculación con las estirpes de *S. fredii* HH103 y HH103 *nopC*Δ.

<i>G. max</i> cv. Williams			
Tratamiento	Número de nódulos	Masa fresca de los nódulos (g)	Masa seca de la parte aérea (g)
HH103	111,33 ± 19,32	1,70 ± 0,17	2,70 ± 0,57
HH103 <i>nopC</i> Δ	81 ± 24,1**	1,11 ± 0,29*	2,39 ± 0,96
Sin inocular	0 ± 0*	0 ± 0*	0,43 ± 0,16*

Los datos representan las medias de 12 plantas. Los valores se tomaron 6 semanas después de la inoculación o tratamiento. Las bacterias aisladas de 20 nódulos formados por cada inoculante mostraron los marcadores de resistencia esperados. Cada tratamiento se comparó individualmente con la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los números de la misma columna seguidos de un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$ y los seguidos de dos asteriscos son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 10\%$.



Figura 64. Fenotipo simbiótico de las estirpes de *S. fredii* HH103 y HH103 *nopCΔ*. Aspecto de la parte aérea de la planta.

4. 6. 2. El gen *nopC* juega un papel importante en la nodulación de *S. fredii* HH103 en *Lotus japonicus*.

La estirpe *S. fredii* HH103 es incapaz de inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de *L. japonicus* (Tabla 18), por lo que la parte aérea de las plantas inoculadas con esta estirpe poseían un fenotipo muy similar a las plantas control sin inocular, aunque sus raíces presentaron una gran cantidad de pseudonódulos (Figura 65). Sin embargo, la estirpe HH103 *ttsI::Ω*, carente de un T3SS funcional, fue capaz de inducir la formación de nódulos fijadores en esta planta llegando a alcanzar un 89% de eficiencia en la nodulación (porcentaje de plantas noduladas con respecto a las no noduladas). Este resultado indica que alguno de los efectores secretados a través del T3SS, o un conjunto de ellos, es reconocido por receptores específicos de *L. japonicus*, como ocurre con multitud de efectores tipo Avr de bacterias patógenas, por lo que el proceso de nodulación se bloquea cuando la estirpe HH103 entra en contacto con la célula hospedadora. Con el fin de determinar qué efector de HH103 es el principal

implicado en este fenotipo, se decidió realizar ensayos de nodulación en *L. japonicus* e incluir el mayor número de mutantes en genes que codifican proteínas Nop. Así, además de los mutantes descritos en esta Tesis hasta el momento, se incluyeron aquellos afectados en los genes *nopD* (= HH103 *nopD*:: Ω) y *nopT* (= HH103 *nopT*:: Ω).

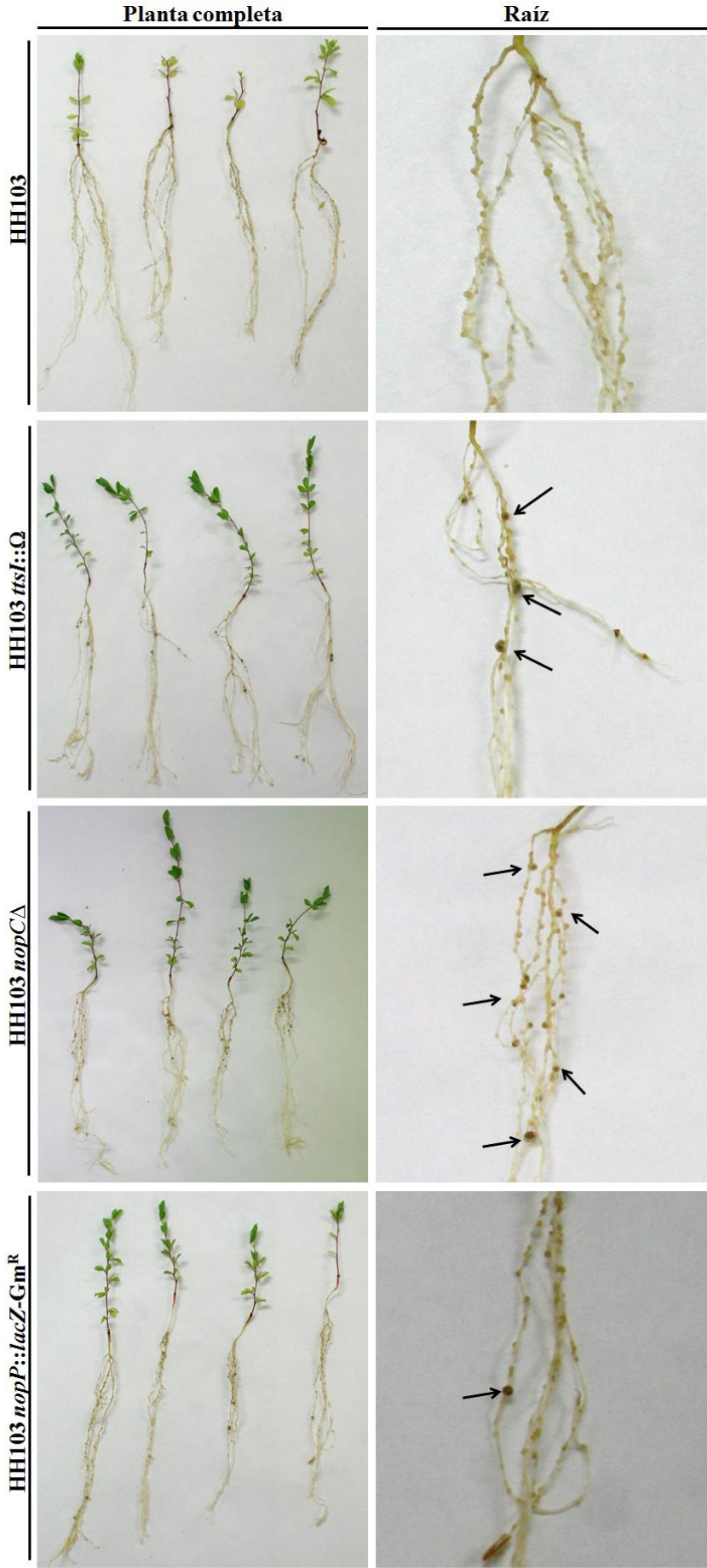
Los resultados de la **Tabla 18** y la **Figura 65** muestran que la mayoría de los mutantes simples afectados en los genes *nop* fueron capaces, a diferencia de la estirpe parental HH103, de inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de *L. japonicus*, con la única excepción del mutante HH103 *nopI* Δ . El mutante HH103 *nopC* Δ es la única estirpe ensayada cuya eficiencia de nodulación (80%) fue muy similar a la descrita para la estirpe mutante HH103 *ttsI*:: Ω , lo que indica que el efector NopC es el efector más perjudicial, a nivel individual, en la nodulación de HH103 con *L. japonicus*. Además, las plantas inoculadas con el mutante HH103 *nopC* Δ presentaron un mayor número de nódulos que aquellas inoculadas con el mutante afectado en el gen *ttsI* (**Figura 65**).

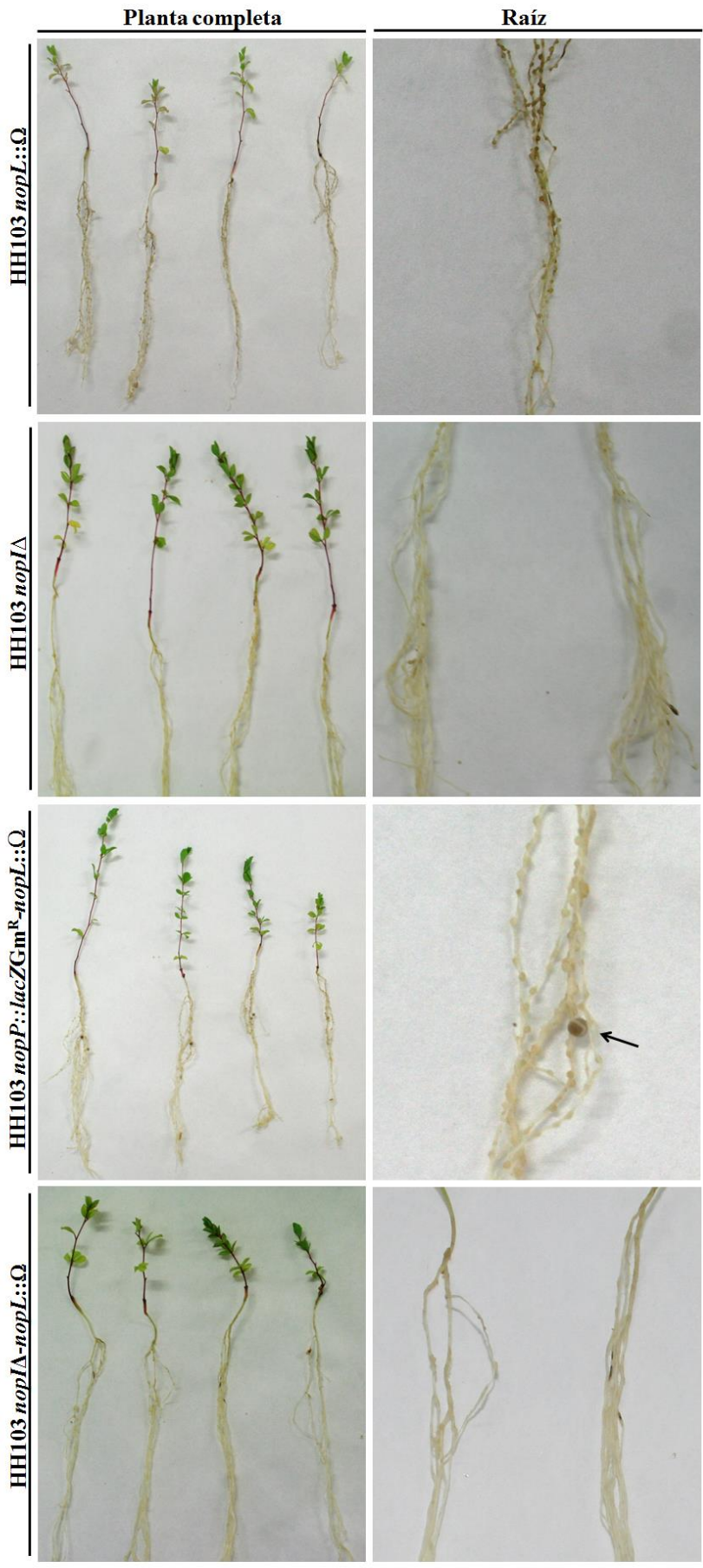
En el caso del mutante en el gen *nopI* no se indujeron ni siquiera pseudonódulos en las raíces de *L. japonicus*, lo que indica que ese gen es fundamental para inducir la formación de los pseudonódulos inducidos por la estirpe parental. El resto de los mutantes simples ensayados indujeron la formación de numerosos pseudonódulos y de nódulos. Además, de todos los dobles mutantes y el triple mutante, afectados en los genes *nopL*, *nopP* y *nopI*, únicamente noduló la estirpe HH103 *nopP*::*lacZ*-Gm^R-*nopL*:: Ω , el único en el que el gen *nopI* es funcional. Por último, las complementaciones de las mutaciones restauraron en gran medida el fenotipo de la estirpe silvestre HH103 (**Tabla 18**).

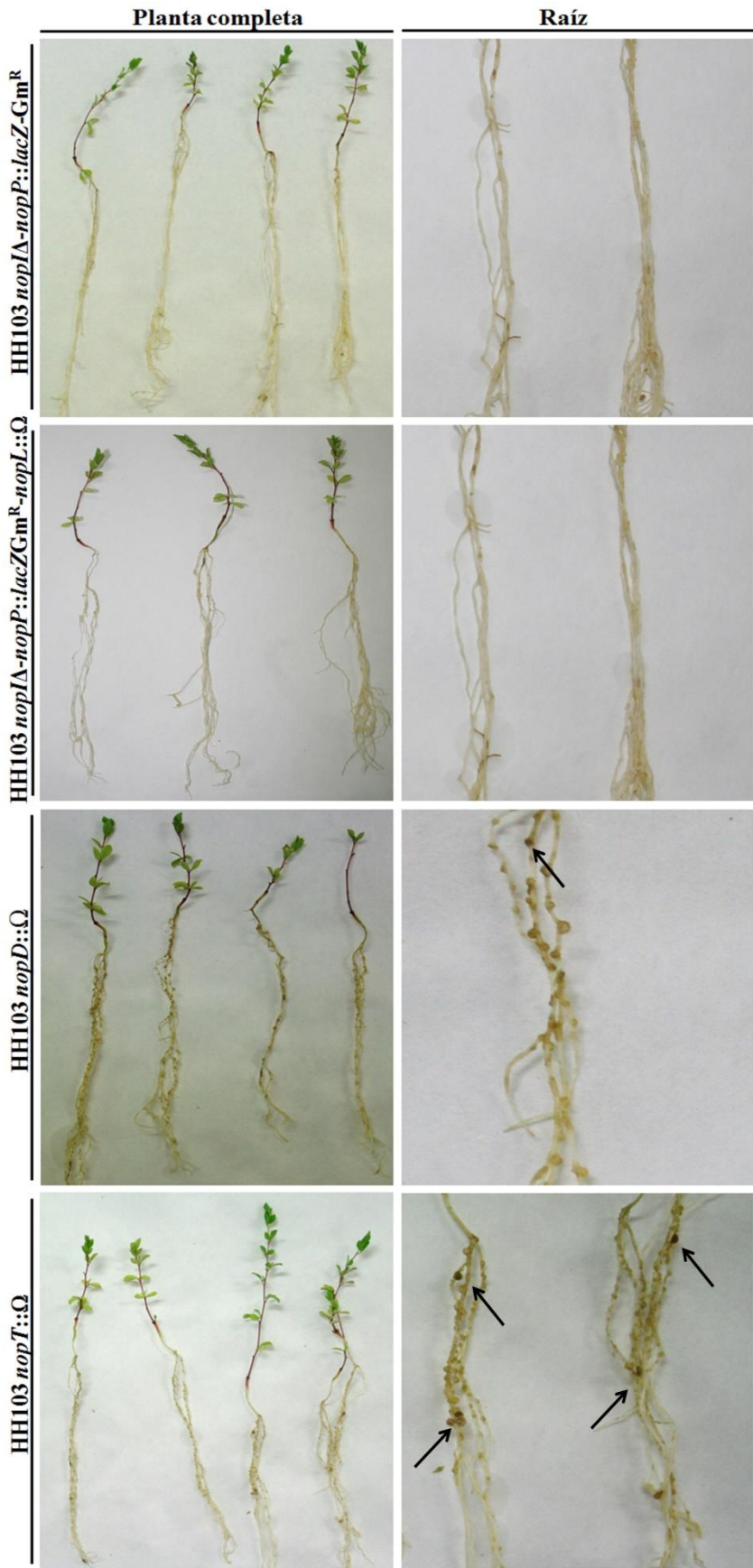
Tabla 18. Respuesta de *L. japonicus* a la inoculación con *S. fredii* HH103 y diversos mutantes derivados afectados en genes relacionados con el T3SS.

<i>Lotus japonicus</i>				
Tratamiento	Plantas noduladas	Media del número de nódulos	Plantas ensayadas	Eficiencia nodulación (%)
HH103	0	0	10	0
HH103 <i>ttsI::Ω</i>	8	4	9	89
HH103 <i>nopCΔ</i>	8	10	10	80
HH103 <i>nopCΔ</i> (pMUS986)	0	0	7	0
HH103 <i>nopP::lacZGm^R</i>	6	1	10	60
HH103 <i>nopP::lacZ-Gm^R</i> (pMUS983)	1	1	7	14
HH103 <i>nopL::Ω</i>	1	1	8	13
HH103 <i>nopL::Ω</i> (pMUS1199)	0	0	8	0
HH103 <i>nopIΔ</i>	0	0	10	0
HH103 <i>nopIΔ</i> (pMUS1215)	0	0	10	0
HH103 <i>nopP::lacZ-Gm^R-nopL::Ω</i>	5	2	9	56
HH103 <i>nopIΔ-nopP::lacZ-Gm^R</i>	0	0	9	0
HH103 <i>nopIΔ-nopP::lacZ-Gm^R-nopL::Ω</i>	0	0	8	0
HH103 <i>nopD::Ω</i>	1	1	5	20
HH103 <i>nopD::Ω</i> (pMUS1213)	0	0	7	0
HH103 <i>nopT::Ω</i>	3	2	10	30
HH103 <i>nopT::Ω</i> (pMUS1214)	0	0	9	0
No inóculo	0	0	8	0

Se realizaron dos ensayos obteniéndose valores similares. Los datos representados corresponden a los valores de entre 7 y 10 plantas de uno de los ensayos. Los valores se tomaron 8 semanas después de la inoculación o tratamiento. La media del número de nódulos se calculó para las plantas que presentaron nódulos en cada uno de los tratamientos. Las bacterias aisladas de los nódulos formados por cada inoculante mostraron los marcadores de resistencia esperados.







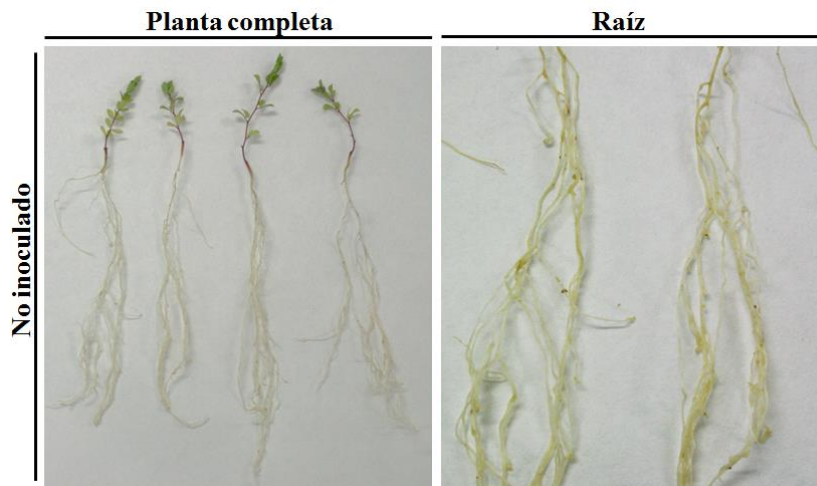


Figura 65. Aspecto de la planta completa (columna izquierda) y detalle de la raíz (columna derecha) de *Lotus japonicus* inoculadas con *S. fredii* HH103 y diversos mutantes derivados afectados en genes relacionados con el T3SS. Las flechas indican el área donde se encuentran los nódulos fijadores.

A partir de los resultados obtenidos en este apartado se pueden destacar las siguientes conclusiones:

nopC de *S. fredii* HH103 está regulado por flavonoides, NodD1 y TtsI. La mutación en este gen no afecta a la secreción del resto de Nop.

NopC de *S. fredii* HH103 es un efector.

NopC de *S. fredii* HH103 es el efector principal responsable de la nodulación de esta estirpe *Lotus japonicus*.

Bloque III

Caracterización de los efectores específicos de *Rhizobium* NopL, NopP y NopI de *S. fredii* HH103

Antecedentes

Diversos trabajos se han centrado en la función que el efector NopL ejerce en la célula hospedadora. Así, se ha descrito que NopL interfiere en la señalización de las MAP quinasas en levaduras y en células de *Nicotiana tabacum* (Bartsev *et al.*, 2003) y que en estos organismos NopL es fosforilada en cuatro serinas que poseen un patrón serina-prolina, un motivo típico de los sustratos de MAP quinasas. Se ha sugerido que NopL podría actuar como sustrato de alguna MAP quinasa y, de alguna manera, evitar la senescencia de la célula hospedadora (Zhang *et al.*, 2011). Además, NopL podría estar involucrada en la modulación de rutas de transducción de señales que culminan en la activación de las proteínas PR (Bartsev *et al.*, 2004). A partir de los primeros estudios sobre la función de NopL en la célula eucariótica se estudió si la proteína NopP de *S. fredii* NGR234 podría ser también un sustrato de quinasas de la planta. Estas sospechas se confirmaron mediante ensayos de fosforilación *in vitro* en los que se vio que NopP es fosforilada por una quinasa tipo tirosina/treonina quinasa, no de tipo MAP quinasa, como ocurría con el efector NopL (Skorpil *et al.*, 2005).

En esta Tesis se han realizado distintos experimentos con el fin de ampliar el conocimiento de la función en la simbiosis de aquellas proteínas efectoras específicas de los rizobios, como NopL, NopP y NopI, que usan un T3SS similar al que utilizan las bacterias patógenas para introducir diversos factores de virulencia en la célula eucariótica hospedadora.

1. Caracterización de la proteína NopL de *S. fredii* HH103.

1. 1. La proteína NopL de *S. fredii* HH103 es fosforilada por una quinasa de raíz de soja.

Como se ha descrito anteriormente, la proteína NopL de *S. fredii* NGR234 es fosforilada por quinasas de la célula hospedadora. Los ensayos de fosforilación *in vitro* realizados por **Bartsev et al, (2003)** mostraron que este efector es fosforilado por una serina/treonina quinasa de tipo MAPKK o derivada de esta ruta. Para demostrar que la proteína NopL de *S. fredii* HH103 es fosforilada por quinasas de la raíz de soja, su hospedador natural, se realizaron ensayos de fosforilación *in vitro* utilizando extractos de proteínas de la raíz de soja Williams y una proteína recombinante compuesta por NopL de *S. fredii* HH103 fusionada a GST (NopL-GST).

1. 1. 1. Expresión *in vitro* y purificación de la proteína NopL de *S. fredii* HH103.

En primer lugar, el gen *nopL* se amplificó mediante PCR usando los cebadores nopLEX-F y nopLEX-R (**Tabla 5**), que portan las dianas de restricción de las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI, respectivamente. El amplicón se secuenció para determinar que no existía ninguna mutación y se clonó en el vector de expresión de proteínas de fusión a GST pGEX 4T-1, previamente digerido con *Bam*HI y *Eco*RI, generando el plásmido pMUS1135. Esta construcción contiene el gen *gst* situado en el extremo amino en fase con el gen *nopL*, cuya expresión está controlada por el promotor inducible del operón *lac*. El plásmido pMUS1135 se transformó en la estirpe BL21 de *E. coli* y la proteína de fusión (NopL-GST) se expresó mediante la activación del cultivo con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (**Figura 66**). La proteína de fusión NopL-GST se purificó para evitar interferencias en los ensayos de fosforilación *in vitro* que se realizaron posteriormente (**Figura 67, A**) y se detectó mediante inmunodetección usando un anticuerpo específico anti-GST (Cell Signalling Technology, EEUU) (**Figura 67, B**). Estos geles presentaban al menos dos bandas que daban señal con el anticuerpo anti-GST. Este hecho podría deberse a que la síntesis de la proteína de fusión se produce en todos los puntos de muestreo (de 0 a 6 horas después de la inducción con IPTG) y la

muestra contendría un gran número de polipéptidos que no se han sintetizado completamente.

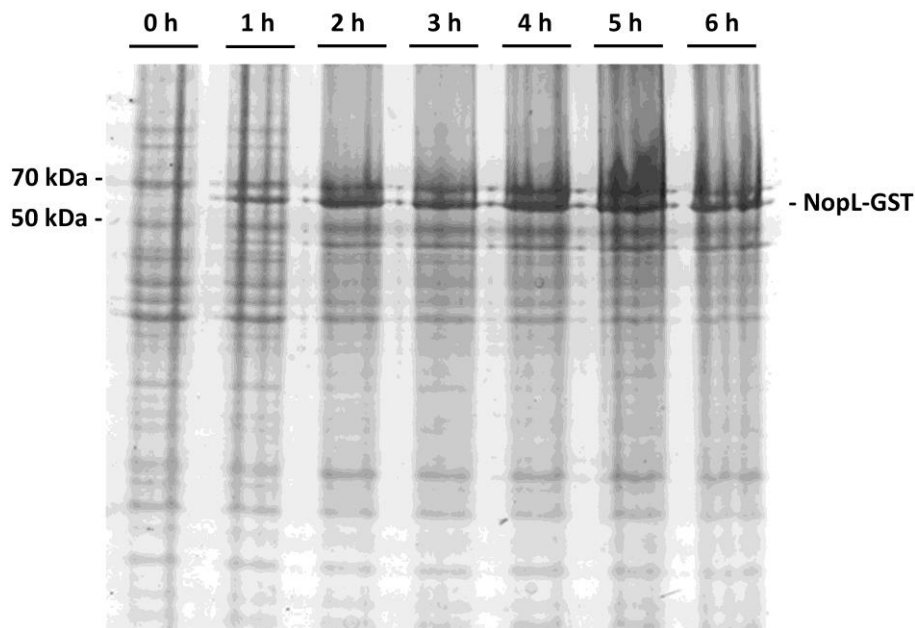


Figura 66. Expresión de la proteína de fusión NopL-GST en la estirpe BL21 (pMUS1135) tras la inducción del cultivo bacteriano con IPTG. A la derecha de la imagen se indica la banda correspondiente a la proteína de fusión NopL-GST y a la izquierda las masas moleculares (kDa) del marcador (Fermentas, EEUU).

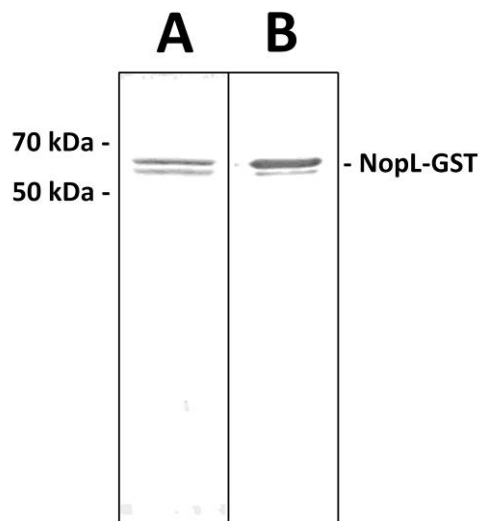


Figura 67. Purificación de la proteína de fusión NopL-GST. **A**, Gel de poliacrilamida teñido con el colorante Coomassie blue. **B**, Inmunodetección de la proteína NopL-GST. A la derecha de la imagen se indica la banda correspondiente a la proteína de fusión NopL-GST y a la izquierda las masas moleculares (kDa) del marcador (Fermentas, EEUU).

1. 1. 2. Ensayos de fosforilación *in vitro* para caracterizar la quinasa que fosforila a NopL de *S. fredii* HH103.

Una vez purificada la proteína recombinante NopL-GST, se realizaron ensayos de fosforilación *in vitro* para determinar si NopL es fosforilada por quinasas de la raíz de soja Williams. Para este fin se obtuvieron extractos proteicos procedentes de raíces de soja no inoculadas o inoculadas con la estirpe silvestre HH103 y cultivadas durante 4 días, debido a que se desconocía si la quinasa implicada podía ser inducible por la presencia del rizobio. La **Figura 68** muestra que la proteína NopL se fosforila por una o más quinasas del extracto de raíz de soja Williams y que la intensidad de la señal obtenida tanto de extractos provenientes de raíces sin inocular o inoculadas con la estirpe silvestre HH103 es similar, por lo que se trata de una quinasa no inducible. En el ensayo se incluyó como control a la proteína GST purificada y se vio que ésta no se encontraba fosforilada (**Figura 68**). Además, se ensayaron por separado los extractos proteicos de las raíces no inoculadas e inoculadas con la estirpe silvestre para demostrar que la señal detectada no se debía a la fosforilación entre las proteínas presentes en los distintos extractos. En los carriles correspondientes a estos controles, mostrados en la **Figura 68**, no se detectó ninguna señal de fosforilación.

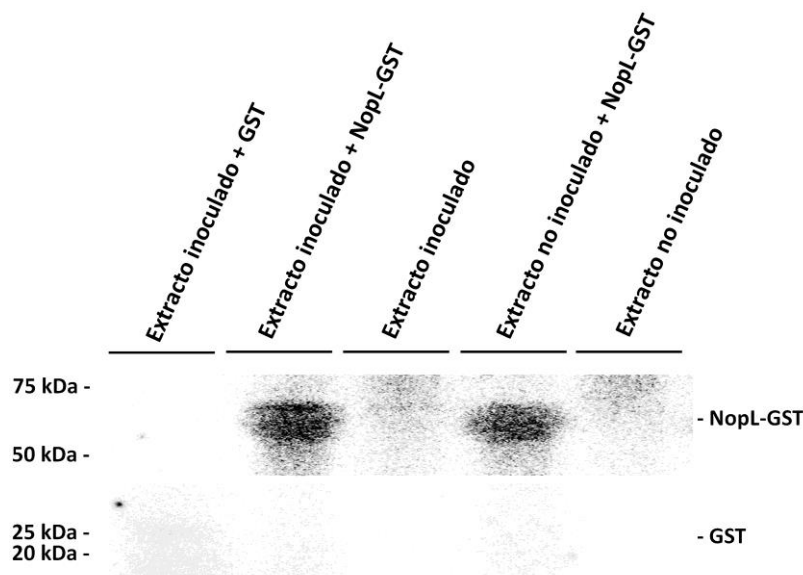


Figura 68. Fosforilación *in vitro* de la proteína NopL por quinasas de la raíz de soja Williams. En todos los carriles se cargaron las mismas concentraciones de proteínas, tanto recombinante como del extracto de raíz vegetal (no inoculado o inoculado con HH103). A la derecha de la imagen se indican las bandas correspondientes a la proteína NopL-GST y a la GST. A la izquierda se indican las masas moleculares (kDa) del marcador (BioRad, EEUU).

La caracterización de la quinasa que fosforila a la proteína NopL se realizó mediante ensayos de fosforilación *in vitro* en los que se incubó la proteína NopL-GST con un extracto proteico de la raíz de soja Williams, previamente inoculado con la estirpe HH103 y una serie de inhibidores de quinasas. Se consideró que existía inhibición en los casos en los que la intensidad de la señal de la banda correspondiente a NopL-GST fosforilada presentó un valor menor o igual al 50% con respecto al control sin inhibidores.

Los resultados mostrados en la **Figura 69** indican que la quinasa involucrada no se inhibió con genisteína, que actúa como inhibidor de las quinasas tipo tirosina quinasa. En cambio, la fosforilación de NopL sí se redujo con un inhibidor de quinasas tipo serina/treonina quinasa (K252a). Este resultado, junto con la inhibición de la fosforilación que se observó tras añadir el compuesto PD98059, que inhibe aquellas quinasas de tipo MAP quinasa quinasa, son concordantes con los datos publicados en el trabajo de **Bartsev *et al.* (2003)** sobre la fosforilación de la proteína NopL de *S. fredii* NGR234. Para determinar si la quinasa que fosforila a NopL depende de calcio se añadieron diferentes compuestos. Entre ellos se usaron el EGTA, que actúa como quelante de calcio, impidiendo que la quinasa que fosforila a NopL disponga del calcio existente en el medio de incubación, el W7, quelante de calmodulina, y KN62, un inhibidor de la proteína calmodulina (CaM) quinasa II. El uso de todos estos compuestos dio como resultado una reducción significativa de la señal de fosforilación de NopL, por lo que la quinasa que fosforila a NopL depende de calcio y calmodulina, pudiendo ser directa o indirectamente una calmodulina (CaM) quinasa II.

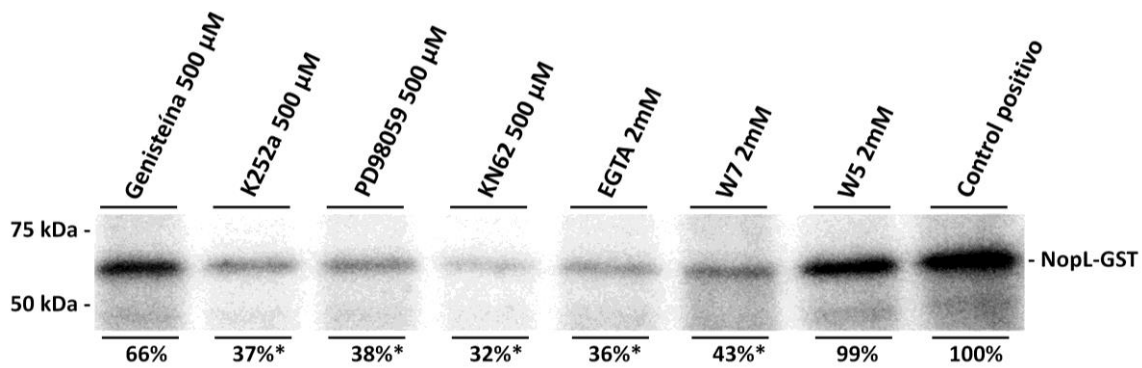


Figura 69. Fosforilación *in vitro* de la proteína NopL por quinasas de la raíz de soja Williams usando distintos inhibidores de quinasas. En todos los carriles se cargaron las mismas concentraciones de proteínas, tanto recombinante como del extracto de raíz vegetal inoculado con HH103 a los 4 d.p.i. Los porcentajes se calcularon mediante el programa informático ImageJ e indican el grado de fosforilación. Se tomó como nivel máximo la intensidad de la señal del control positivo (sin inhibidor). Los valores por debajo del 50% se consideraron como inhibición de la fosforilación (asterisco). A la derecha de la imagen se indica la banda correspondiente a la proteína NopL-GST y a la izquierda las masas moleculares (kDa) del marcador (BioRad, EEUU).

1. 1. 3. Detección de la quinasa de soja responsable de la fosforilación de NopL.

Posteriormente y gracias a que el genoma de soja se encuentra disponible en las bases de datos, se intentó determinar qué quinasa de la raíz de soja Williams es la que fosforila al efector NopL de HH103. Para ello se realizaron ensayos de quinasas "en gel", en los que la proteína NopL-GST se encontraba embebida en el gel de poliacrilamida. Las proteínas del extracto de la raíz de soja Williams inoculada con la estirpe HH103 y procesada a los 4 d.p.i., fueron separadas mediante electroforesis usando el gel de poliacrilamida que contiene a NopL-GST. De este modo, la señal de fosforilación detectada en el gel correspondía a la quinasa del extracto que fosforila al efector NopL. En la **Figura 70** se observa una intensa señal de fosforilación correspondiente a una banda cuyo tamaño excede los 100 kDa que correspondería a la quinasa que fosforila a NopL.

Comúnmente, los geles elaborados para el protocolo de fosforilación en gel se realizan en condiciones desnaturalizantes añadiendo SDS a la mezcla. Sin embargo, muchas quinasas no recuperan la actividad una vez que han sido incubadas con SDS, siendo la principal limitación de esta metodología (Heal *et al.*, 2000). Así, los primeros ensayos se realizaron en condiciones desnaturalizantes sin obtener ningún resultado, por

lo que se decidió desarrollar el método usando geles nativos. Este hecho podría ser el responsable de que durante la electroforesis las proteínas del extracto no avanzaran con fluidez, por lo que la mayoría de ellas permanecieron en la parte superior del gel. Con todo ello, el tamaño real de la quinasa que fosforila NopL no tiene por qué ser diferente a lo indicado por el marcador del peso molecular. La zona enmarcada en la **Figura 70, A**, que corresponde al gel gemelo, teñido con Coomasie y sin tratar con radiactividad, se recortó, se procesó y las proteínas de la banda fueron secuenciadas.

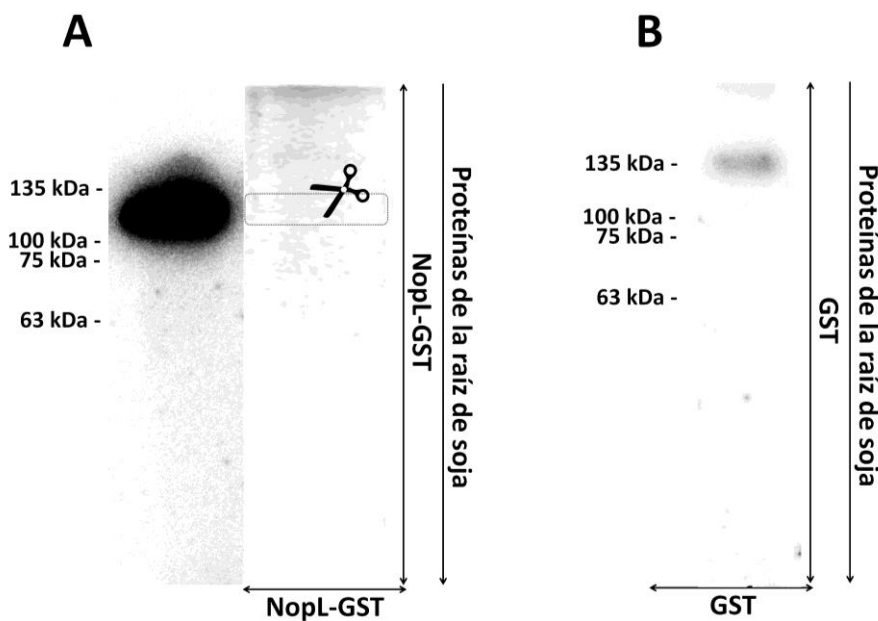


Figura 70. Ensayo de fosforilación "en gel". **A**, Gel de acrilamida en condiciones no desnaturizantes (sin SDS) que contiene la proteína de fusión NopL-GST. La imagen de la derecha se corresponde con un gel gemelo teñido con azul de Coomasie (las proteínas del extracto de la raíz de soja no se aprecian con claridad debido a que la concentración que se cargó en cada pocillo fue muy baja). **B**, Gel de acrilamida en condiciones no desnaturizantes (sin SDS) que contiene sólo la proteína GST. A la izquierda de cada figura se indican las masas moleculares (kDa) del marcador (gTPbio, gTPbio.com).

Entre las proteínas identificadas a partir de la secuenciación de la porción del gel recortado no se identificó ninguna quinasa (**Anexo 1**). Sin embargo, debido al constante incremento en relación a la información sobre las funciones de los genes de soja, más tarde se realizó una comparación de los péptidos resultantes de la secuenciación frente al genoma de *G. max* (**Tabla 19**). Mediante este análisis se identificaron dos quinasas. Una de ellas es un receptor quinasa de tipo HSL1, cuya función en *A. thaliana* se encuentra relacionada con la actividad de tipo serina/treonina quinasa. La segunda

quinasa identificada en el estudio corresponde con una serina/treonina quinasa de tipo ATR de soja. La quinasa ATR y sus ortólogos juegan un papel fundamental en la regulación del ciclo celular, fosforilando múltiples sustratos para provocar la inhibición del ciclo celular en condiciones de estrés por daño en el ADN (Cortez, 2003). Así, en *A. thaliana* se ha descrito que esta proteína regula el punto de control de la fase G2 del ciclo celular (Culligan *et al.*, 2004). Los puntos de control son mecanismos moleculares que verifican que se cumplen las condiciones necesarias para permitir el paso de una fase del ciclo celular a otra, impidiendo así que ciertos eventos, como daños en el ADN, trasciendan a lo largo del ciclo. Sin embargo, la función de estas proteínas ha sido ampliamente estudiada en animales y levaduras, mientras que la información que se dispone sobre la función de este tipo de quinasas de plantas es muy escasa.

Tabla 19. Proteínas de soja resultantes de la comparación de los péptidos provenientes de la secuenciación a partir de la banda recortada del ensayo de fosforilación “en gel” representado en la **Figura 70 (A)**.

Descripción de la proteína (<i>G. max</i>)	Número de acceso (NCBI)
Serina/treonina quinasa de tipo ATR	XP_003535761
Glutamato sintetasa (NADH). Isoforma X3 de tipo amiloplástico	XP_006581639
Lipoxigenasa	AAA33988
Metionina sintetasa	NP_001235794
5-metil-tetrahidropteroiltriglutamatohomocisteína metiltransferasa 1. Isoforma 1	XP_003554033
Linolato 9S-lipoxigenasa de tipo 4	XP_006599243
Proteína no caracterizada LOC100499763	NP_001235680
Posible β -1,3-galactosiltransferasa de tipo 20	XP_003524877
Triptófano sintetasa. Subunidad α	BAE95381
Receptor quinasa de tipo HSL1	NP_001241340

1. 2. La proteína NopL de *S. fredii* HH103 se localiza principalmente en el núcleo de la célula hospedadora.

Hasta la fecha, no se conoce la localización de ningún efector del T3SS de *S. fredii* HH103 en la célula eucariota. Para intentar determinar la localización de NopL dentro de la célula vegetal, las células epidérmicas de las hojas de la planta *N. benthamiana* se transformaron con la estirpe *A. tumefaciens* CV3101 (pMUS1250), de forma que el efector NopL se co-expresa junto a la proteína de fluorescencia amarilla (YFP, del inglés, Yellow Fluorescent Protein) (NopL-YFP). El gen *nopL* se amplificó con los cebadores *nopLattB1* y *nopLattB2sinstop* que contienen las secuencias necesarias para la clonación del amplicón mediante el sistema Gateway (Invitrogen). El producto de PCR de 1,1 kb se analizó mediante secuenciación y se clonó en el plásmido pDONR207 generando el plásmido pMUS1243. Posteriormente, el gen *nopL* procedente de pMUS1243 se clonó en el plásmido pEG101 y se fusionó al gen que codifica para la YFP, generándose el plásmido pMUS1250.

Para confirmar que las células de las hojas de *N. benthamiana* expresaban de forma transitoria la proteína de fusión NopL-YFP, se realizó un ensayo de inmunodetección. Para ello se usó un anticuerpo específico del epitopo HA (Cell Signalling Technology, EEUU), ya que éste se coexpresa junto a la proteína de fusión NopL-YFP. Además, se incluyeron los extractos proteicos de hojas de *N. benthamiana* transformadas con las estirpes que se usaron como control negativo y positivo en los ensayos de microscopía confocal: CV3101 (pEG100), que no expresa la YFP, y CV3101 (pEG104), que sí expresa la YFP, aunque ninguna de estas dos estirpes expresan el epitopo HA. En ambos casos no se observó señal en el *western blot*, pero sí en el carril que corresponde al extracto de hojas de *N. benthamiana* en las que se expresó la proteína de fusión NopL-YFP a través de la estirpe CV3101 (pMUS1250) (**Figura 71**).

Los datos obtenidos mostraron que en la mayoría de los ensayos la proteína NopL de *S. fredii* se localizaba en el núcleo de la célula vegetal (**Figura 72 (A)**), sin embargo, en otros casos, se observó en el citoplasma de la célula (**Figura 72 (B)**).

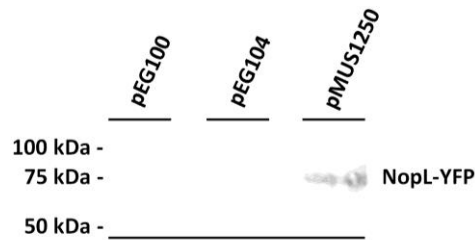


Figura 71. Inmunodetección de la proteína NopL en hojas de tabaco. Las proteínas de cada carril provienen de hojas de *N. benthamiana* transformadas con las estirpes CV3101 (pEG100), CV3101 (pEG104) y CV3101 (pMUS1250) de *A. tumefaciens*. A la derecha de cada imagen se indica la banda correspondiente a la proteína NopL-YFP y a la izquierda las masas moleculares (kDa) del marcador (BioRad, EEUU).

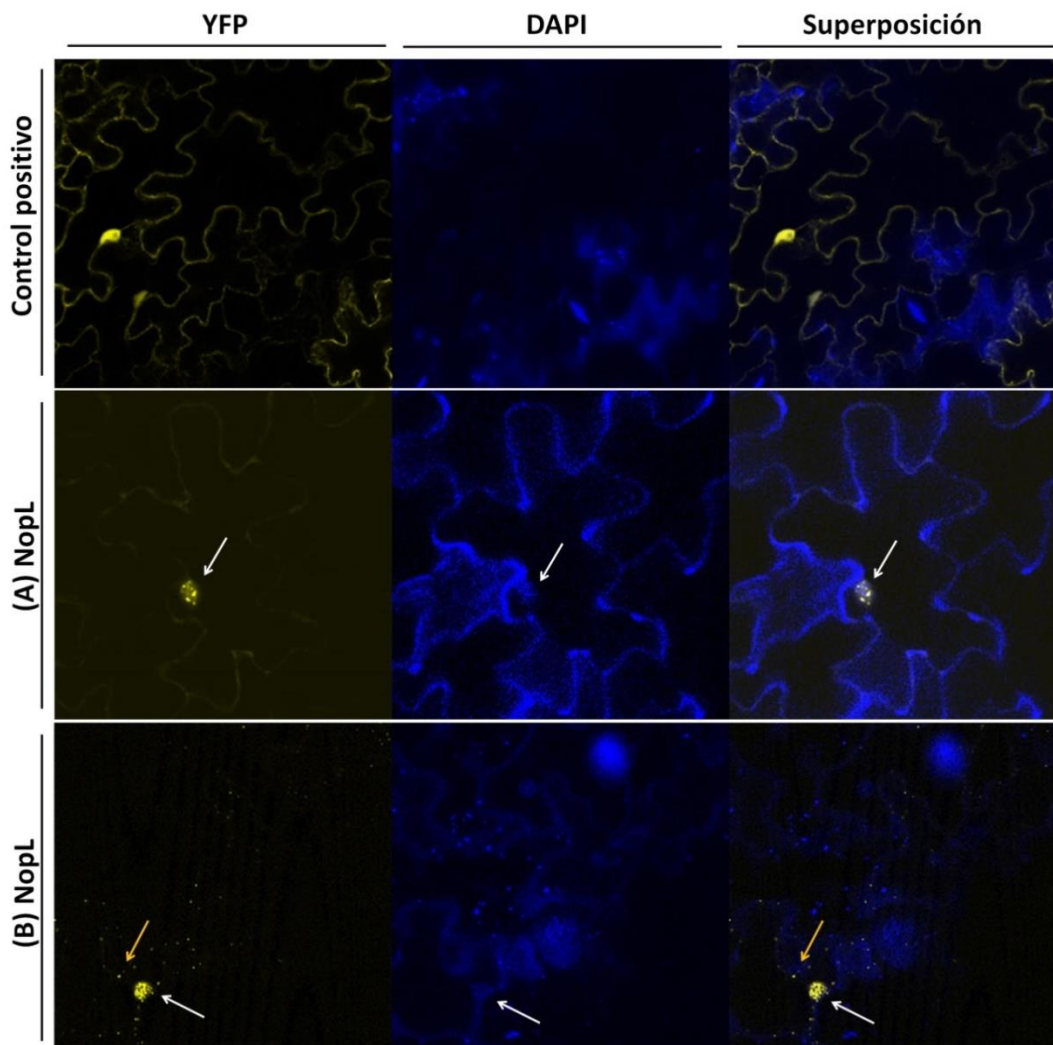


Figura 72. Localización de la proteína NopL en células foliares de *N. benthamiana*. Las flechas de color blanco indican la localización de NopL-YFP en el núcleo. Las flechas de color amarillo indican la localización de NopL-YFP en el citoplasma de la célula. **A**, localización de NopL-YFP exclusivamente en el núcleo. **B**, localización de NopL-YFP en el núcleo y en el citoplasma. Se realizaron 3 ensayos independientes en los que se analizaron 3 hojas de cada planta.

Las células de las hojas de tabaco poseen una estructura peculiar, presentando una gran vacuola que empuja a todos los componentes del citoplasma hacia la periferia de la célula vegetal. Este fenómeno aumenta la complejidad de determinar la localización exacta de aquellas proteínas que se encuentran en el citoplasma. Sin embargo, tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula eucariota, NopL se encontraba localizada en focos muy claros (**Figura 73**).

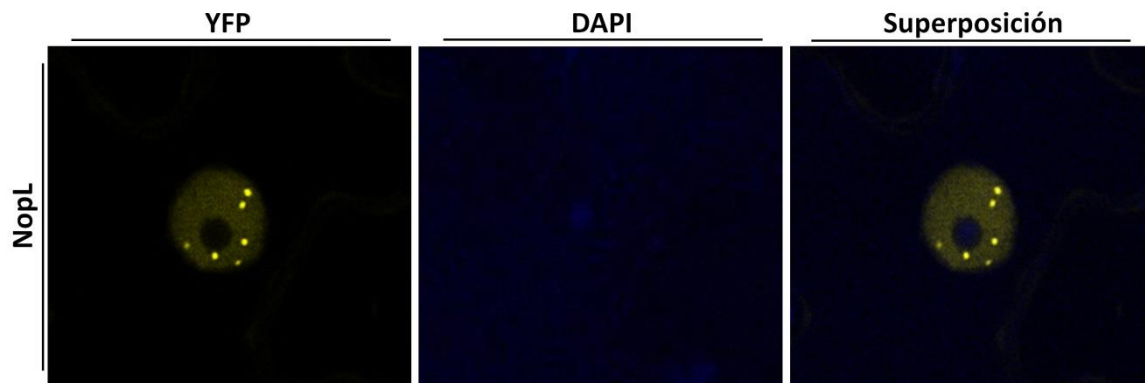


Figura 73. Localización de la proteína NopL en el núcleo de la célula foliar de *N. benthamiana*.

1. 3. Estudios para la identificación de la función del efector NopL de *S. fredii* HH103 en la célula eucariota.

1. 3. 1. Determinación de posibles dianas conservadas en células eucariotas para identificar la función de NopL. Uso de un *array* de levaduras.

Para intentar identificar la función biológica del efector NopL de *S. fredii* HH103 en la célula eucariota se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, debido a que en los últimos años se han desarrollado metodologías basadas en el uso de este microorganismo para estudiar la implicación de los efectores del T3SS en las rutas conservadas de la célula eucariota (Curak *et al.*, 2009; Jamir *et al.*, 2004; Siggers y Lesser, 2008; Valdivia, 2004). En esta Tesis se utilizó la técnica desarrollada por Bossis *et al.* (2011) (apartado 3. 5. de Material y Métodos). Para ello, el gen *nopL* de *S. fredii* HH103 se amplificó por PCR con los cebadores *nopL_pGML10_F* y *nopL_pGML10_R* y el amplicón se clonó en el vector de expresión *pGML10*, generando el plásmido *pMUS1183*. Éste se transformó en cada una de las estirpes del *array* y se observó que la expresión de NopL afectaba al crecimiento de las estirpes de

levadura mutadas en los genes *rpn4*, *ire1*, *las21*, *nup133*, *kre6*, *psd1*, *pdf1*, *ydj1* y *bck1* (estirpes hipersensibles al efector) (**Tabla 20**).

El análisis de las interacciones sintéticas letales para NopL indicó la existencia de una conexión entre NopL y el retículo endoplasmático. De entre todos los genes, *ire1*, *las21* y *kre6* codifican para componentes integrales de la membrana del retículo endoplasmático, mientras que *rpn4* y *ydj1* codifican para elementos relacionados con el plegamiento de las proteínas y su degradación en el retículo endoplasmático. Sin embargo, los análisis estadísticos llevados a cabo no determinaron la existencia de ningún gen congruente para NopL. Este hecho hace que no se pueda asignar ninguna diana específica de la levadura para NopL, lo que podría deberse a que una posible diana de NopL sea un gen o un proceso esencial de la levadura que no se encuentre cubierto por la red de interacciones sintéticas letales de la que se dispone.

Tabla 20. Determinación de los genes de *S. cerevisiae* congruentes para NopL.

Gen	Solap. SL*	Total	<i>rpn4</i>	<i>ire1</i>	<i>las21</i>	<i>nup133</i>	<i>kre6</i>	<i>psd1</i>	<i>pdf1</i>	<i>ydj1</i>	<i>bck1</i>	Valor p*	Puntuación
<i>stt4</i>	4	11				1		1	1		1	8,01E-08	7,1
<i>glc7</i>	3	9				1		1			1	6,36E-06	5,2
<i>rpn4</i>	3	13		1					1	1		1,44E-05	4,84
<i>alf1</i>	2	2	1						1			2,05E-05	4,69
<i>mdj1</i>	2	2	1					1				2,05E-05	4,69
<i>rad27</i>	3	14	1			1				1		2,72E-05	4,56
<i>arp1</i>	3	16				1			1		1	4,17E-05	4,38
<i>sba1</i>	3	16		1		1					1	4,17E-05	4,38
<i>pom34</i>	2	3				1	1					6,15E-05	4,21
<i>cdc28</i>	2	4	1							1		1,23E-04	3,91
<i>aim26</i>	2	4							1		1	1,23E-04	3,91
<i>rpa49</i>	2	5	1						1			2,04E-04	3,69
<i>cwh41</i>	2	5					1				1	2,04E-04	3,69
<i>pdi1</i>	2	6		1				1				3,05E-04	3,52
<i>trs65</i>	2	6					1				1	3,05E-04	3,52
<i>ccw12</i>	2	6							1		1	3,05E-04	3,52
<i>cnb1</i>	2	8	1								1	0,000566	3,25
<i>doc1</i>	2	9	1			1						0,000726	3,14
<i>pkc1</i>	2	9			1						1	0,000726	3,14
<i>pol32</i>	2	9				1				1		0,000726	3,14
<i>ume6</i>	2	10				1			1			9,06E-04	3,04

* Solap. SL: solapamiento SL. El valor p deriva de la distribución hipergeométrica y se calculó de acuerdo con **Kramer et al. (2007)**. La puntuación hace referencia a la congruencia de cada gen con NopL y se define como el logaritmo negativo en base 10 del valor p .

El análisis de los genes congruentes para NopL desveló que, aunque no existe un resultado claro, NopL podría estar relacionado con las proteínas codificadas por los genes *stt4* y *glc7*. STT4 (phosphatidylinositol-4-kinase) es una proteína que actúa en el citoplasma o en la mitocondria de la célula eucariota, en la ruta de la proteínas quinasa Pkc1. STT4 se requiere para el mantenimiento de la morfología de la vacuola, la integridad de la pared celular y la organización del citoesqueleto de actina. Por otro lado, la proteína GLC7 se localiza en el núcleo de la célula y funciona como una subunidad catalítica de la proteína fosfatasa serina/treonina de tipo I y como componente del factor de poliadenilación y corte (CPF, del inglés Cleavage and Polyadenylation Factor). Además, está involucrada en varios procesos, incluyendo el metabolismo del glucógeno, la esporulación, la mitosis y, además, se acumula en las proyecciones de acoplamiento mediante la interacción de Afr1p, interacciona con muchas subunidades reguladoras, actúa en la regulación del transporte de Hxk2p entre el citoplasma y el núcleo y su importación al núcleo se inhibe en el punto de control del ciclo durante el ensamblaje del huso mitótico.

1. 3. 2. Identificación de proteínas que interaccionan con NopL en hojas de la planta modelo *Nicotiana benthamiana*.

Con el fin de ampliar la información sobre la función de NopL de *S. fredii* HH103 en la célula eucariota se decidió realizar un ensayo de inmunoprecipitación para conocer qué proteínas vegetales podrían interaccionar con NopL. Para ello, NopL se expresó de forma transitoria en las hojas de *N. benthamiana* que se transformaron con la estirpe *A. tumefaciens* CV3101 (pMUS1250). Las proteínas que co-inmunoprecipitan con NopL, es decir, aquellas que podrían interaccionar con este efector, se secuenciaron y se obtuvieron una serie de candidatos (**Tabla 21**). Estas proteínas provienen de una selección basada en: **i)** la aparición de la proteína en las dos réplicas de las muestras de hojas en las que se expresa de forma transitoria NopL, **ii)** que la proteína identificada no aparezca en el control negativo, **iii)** que se encuentre altamente representada en cuanto a número de péptidos y **iv)** que no esté relacionada con procesos que ocurren en el cloroplasto.

Tabla 21. Identificación de las proteínas del extracto de hojas de *N. benthamiana* que interactúan con NopL en ensayos de inmunoprecipitación.

Número de acceso	Proteína	AA	kDa	pI
P43643	Factor de elongación 1- α (<i>Nicotiana tabacum</i>)	447	49,3	9,13
Q67BD0	HSP70-3 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	648	70,9	5,25
Q9ZRD1	NTGP4 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	344	38,5	5,41
O49905	Poliubiquitina (<i>Nicotiana tabacum</i>)	305	34,3	7,53
D6PZY5	Proteína rica en glicina de unión a ARN (<i>Nicotiana tabacum</i>)	156	15,6	5,66
Q40567	Calreticulina (<i>Nicotiana tabacum</i>)	389	44,5	4,55
Q76DY0	Proteína de unión a motivos AG (<i>Nicotiana tabacum</i>)	326	36,0	6,67
Q8W1L2	Catalasa (<i>Nicotiana tabacum</i>)	227	25,9	6,76
P36182	HSP82 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	499	58,0	5,15
Q9LEB0	Pectinesterasa (<i>Nicotiana tabacum</i>)	579	63,4	9,23
Q8L6J9	Subunidad grande de la carbamoil fosfato sintetasa (<i>Nicotiana tabacum</i>)	1203	132,0	5,91
F8QMT0	Inhibidor del ciclo celular del estigma/estilo (<i>Nicotiana tabacum</i>)	154	18,2	9,82
P0DI50	Proteína de membrana de la banda de Caspary (<i>Nicotiana tabacum</i>)	209	22,2	8,31
Q67BD1	HSP70-2 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	653	71,2	5,19
Q38MB2	I2 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	192	21,8	7,90
I7FHN2	MAP quinasa (<i>Nicotiana tabacum</i>)	370	42,7	8,03
Q948S4	Myb (<i>Nicotiana tabacum</i>)	588	65,8	8,59
Q9FZ08	Patatin (del tipo) (<i>Nicotiana tabacum</i>)	411	45,1	7,93
Q9SC79	Pectinesterasa (<i>Nicotiana tabacum</i>)	266	29,3	9,92
Q40554	Subunidad 3 del factor de iniciación eucariótico (<i>Nicotiana tabacum</i>)	958	111,5	9,38

Se realizaron dos réplicas de este ensayo y se incluyeron únicamente las proteínas que se detectaron en ambas réplicas y las que no se encuentran relacionadas con los procesos que ocurren en el cloroplasto, además de descartar aquellas que se unieron a la inmunoglobulina G (IgG) o a la resina (control negativo). **AA**, aminoácidos. **pI**, punto isoeléctrico.

Entre las proteínas identificadas se encontraron algunas relacionadas con la pared celular vegetal (pectinesterasas y proteína de membrana de la banda de Caspary), con el metabolismo, con los ácidos nucleicos (Myb) y también proteínas de choque térmico o HSP (HSP, del inglés, Heat Shock Protein). Además, se identificó una posible MAPK (MPK15) de tipo serina/treonina y dos proteínas relacionadas con el sistema inmune, I2 y NTGP4. El ensayo también indicó la posible interacción entre NopL y una proteína denominada calreticulina.

A partir de los resultados obtenidos en este apartado se pueden destacar las siguientes conclusiones:

NopL de *S. fredii* HH103 se encuentra localizada fundamentalmente en el núcleo de la célula hospedadora en forma de focos nucleares.

NopL de *S. fredii* HH103 es fosforilada por una quinasa de la raíz de la soja. La cascada de señales que culmina en la fosforilación de NopL es dependiente de calcio y en ella participa al menos una MAPKK de tipo serina/treonina quinasa..

NopL *S. fredii* de HH103 podría interactuar con proteínas relacionadas con el retículo endoplasmático, como aquellas que son del tipo de las calreticulinas o proteínas de choque térmico. La localización de NopL en el núcleo en forma de núcleos localizados podría indicar también una posible función de NopL, directa o indirectamente, de regulación de la transcripción.

2. Caracterización de la proteína NopP de *S. fredii* HH103.

2. 1. La proteína NopP de *S. fredii* HH103 es fosforilada por una quinasa de la raíz de soja.

Como se ha descrito anteriormente, la proteína NopP de *S. fredii* NGR234 es fosforilada por quinasas de las células de la raíz de diversas leguminosas hospedadoras. **Skorpil et al. (2005)** determinaron que el efector NopP de *S. fredii* NGR234 se fosforila en el dominio amino terminal que comprende los primeros 62 aminoácidos. Además, comprobaron que la fosforilación se inhibía parcialmente por inhibidores de quinasas de tipo serina/treonina quinasas y tirosina quinasas. En base a estos antecedentes, se quiso comprobar si la proteína NopP de *S. fredii* HH103 se fosforila por quinasas de la raíz de soja, su hospedador natural. Para ello se realizaron ensayos *in vitro* utilizando extractos de proteínas de la raíz de esta leguminosa y la proteína recombinante NopP de *S. fredii* HH103 fusionada a GST.

2. 1. 1. Expresión y purificación *in vitro* de la proteína NopP de *S. fredii* HH103.

En primer lugar, el gen *nopP* de *S. fredii* HH103 se amplificó mediante PCR usando los cebadores attB1nopP y attB2nopP (**Tabla 5**), que poseen las secuencias necesarias para la clonación mediante el sistema Gateway (Invitrogen, EEUU). El amplicón resultante, de aproximadamente 0,87 kb, se secuenció y se comprobó que no existía ninguna mutación en su secuencia. El producto de PCR se clonó en el vector pDONR221 dando lugar al plásmido pMUS1149. Finalmente, el fragmento amplificado y clonado en pDONR221 se sub-clonó en el vector de destino denominado pGEX KG generando el plásmido pMUS1157. Esta construcción contiene el gen *gst* fusionado al extremo amino del gen *nopP*, cuya expresión está controlada por el promotor inducible del operón *lac*. El plásmido pMUS1149 se transformó en la estirpe BL21 de *E. coli* y la proteína NopP de fusión a GST (NopP-GST) se expresó mediante la inducción del cultivo con IPTG (**Figura 74**). La proteína de fusión NopP-GST se purificó para evitar interferencias en los ensayos de fosforilación *in vitro* que se realizaron posteriormente (**Figura 75, A**). La detección de NopP-GST se realizó mediante inmunodetección usando un anticuerpo anti-GST (Cell Signalling Technology, EEUU) (**Figura 75, B**).

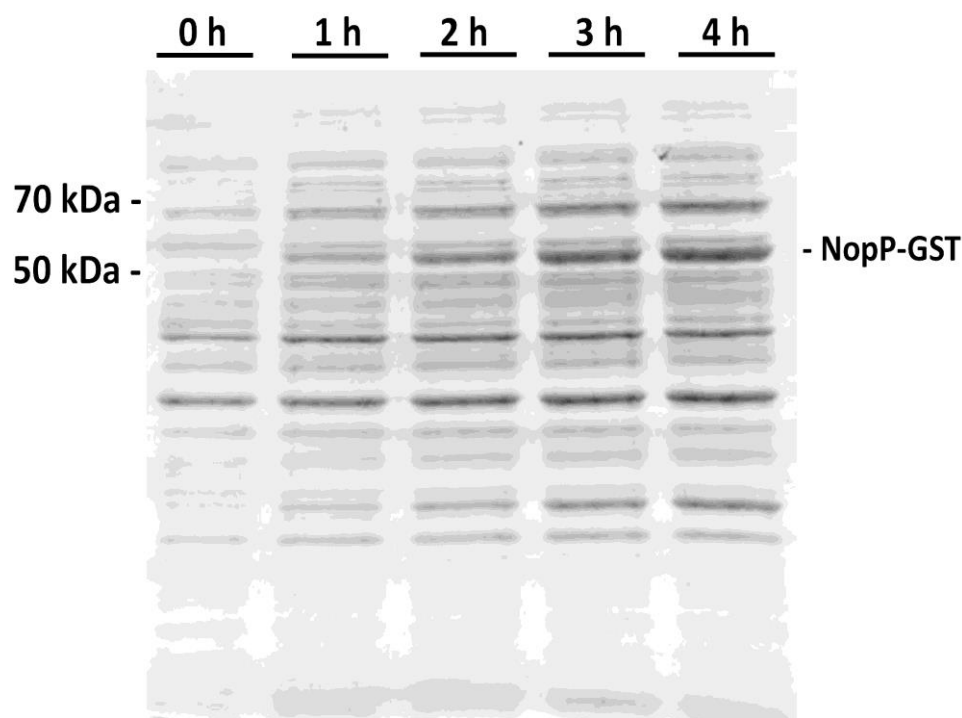


Figura 74. Expresión de la proteína de fusión NopP-GST por la estirpe BL21 tras la inducción del cultivo con IPTG. A la derecha se indica la banda correspondiente a la proteína de fusión NopP-GST y a la izquierda las masas moleculares (kDa) del marcador (Fermentas, EEUU).

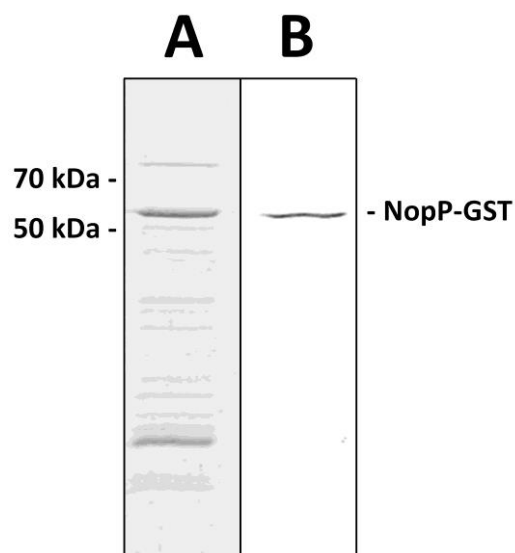


Figura 75. Purificación de la proteína de fusión NopP-GST. **A**, Gel de poliacrilamida teñido con el colorante azul de Coomassie. **B**, Inmunodetección de la proteína NopP-GST. A la derecha de la imagen se indica la banda correspondiente a la proteína de fusión NopP-GST y a la izquierda las masas moleculares (kDa) del marcador (Fermentas, EEUU).

2. 1. 2. Ensayos de fosforilación *in vitro* para caracterizar la quinasa que fosforila a NopP de *S. fredii* HH103.

Una vez que se obtuvo la proteína recombinante NopP-GST, se realizaron ensayos de fosforilación *in vitro* para determinar si NopP se fosforila por quinazas de la raíz de soja. Para este fin se obtuvieron extractos proteicos procedentes de raíces de soja no inoculadas o inoculadas con la estirpe HH103 a los 4 días de crecimiento. La **Figura 76** muestra que la proteína NopP se fosforila por alguna quinasa de la raíz de soja proveniente de raíces no inoculadas o inoculadas, por lo que se trata de una quinasa no inducible. En el ensayo se incluyó como control a la proteína GST purificada y se vio que ésta no se encontraba fosforilada (**Figura 76**). Además, se ensayaron por separado los extractos proteicos de las raíces no inoculadas e inoculadas con la estirpe silvestre para demostrar que la señal detectada no se debía a la fosforilación entre las proteínas presentes en los distintos extractos. En los carriles correspondientes a estos controles, mostrados en la **Figura 76**, no se detectó ninguna señal de fosforilación. Por lo tanto, las bandas detectadas y mostradas en la **Figura 76** se deben exclusivamente a la fosforilación del efector NopP.

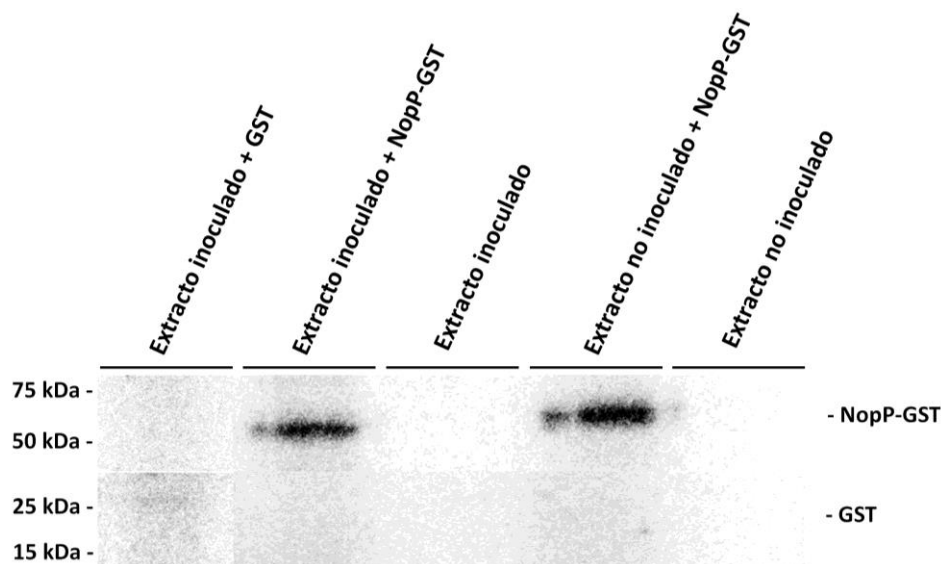


Figura 76. Fosforilación *in vitro* de la proteína NopP por quinazas de la raíz de soja. En todos los carriles se cargaron las mismas concentraciones de proteínas, tanto recombinante como del extracto de raíz vegetal (no inoculado o inoculado con HH103 a los 4 d.p.i.). A la derecha de la imagen se indican las bandas correspondientes a la proteína NopP-GST y a GST. A la izquierda se indican las masas moleculares (kDa) del marcador (BioRad, EEUU).

La caracterización de la quinasa que fosforila a la proteína NopP se realizó mediante ensayos de fosforilación *in vitro* en los que se incubó la proteína NopP-GST con un extracto proteico de raíz de soja inoculada con la estirpe HH103 y procesada a 4 días, y los mismos inhibidores de quinasas que se utilizaron en el **apartado 1. 1. 2. del bloque III de Resultados**. Se consideró que existía inhibición en los casos en los que la intensidad de la señal de la banda fosforilada presentó un valor menor o igual al 50% respecto al control positivo (sin inhibidor). La **Figura 77** muestra que la quinasa que fosforila a NopP se inhibió por genisteína y, en menor medida, por el compuesto K252a, que actúan como inhibidores de las quinasas tipo tirosina quinasa y serina/treonina quinasa, respectivamente. Sin embargo, esta quinasa no se inhibió mediante la incubación con el compuesto PD98059, que inhibe la fosforilación por quinasas de tipo MAPKK. Los resultados obtenidos fueron muy similares a los publicados por **Skorpił et al. (2005)**, por lo que parece probable que la proteína NopP de las estirpes HH103 y NGR234 de *S. fredii* sean sustrato de la misma quinasa. Además, se quiso determinar si la quinasa que fosforila a NopP es dependiente de calcio. Para ello se utilizaron los compuestos KN62 (inhibidor de calmodulina (CaM) quinasa II), EGTA (quelante de iones Ca^{++}) y W7 (inhibidor de la calmodulina) y todos ellos redujeron parcialmente la señal de fosforilación.

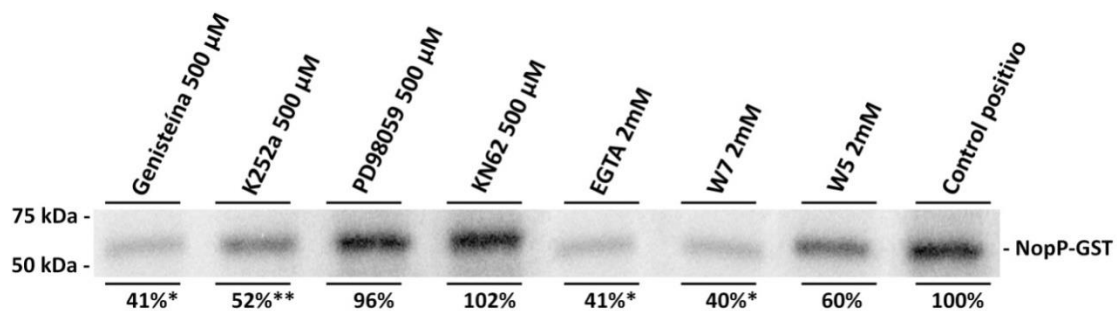


Figura 77. Fosforilación *in vitro* de la proteína NopP por quinasas de la raíz de soja Williams usando distintos inhibidores de quinasas. En todos los carriles se cargaron las mismas concentraciones de proteínas, tanto recombinante como del extracto de raíz vegetal (no inoculado o inoculado con HH103 a los 4 d.p.i.). Los porcentajes se calcularon mediante el programa informático “ImageJ” e indican el grado de fosforilación. Se tomó como nivel máximo la intensidad de la señal del control positivo (sin inhibidor). Los valores por debajo del 50% se consideraron como inhibición de la fosforilación (asterisco) al igual que el valor 52% (doble asterisco). A la derecha de la imagen se indica la banda correspondiente a la proteína NopP-GST y a la izquierda las masas moleculares (kDa) del marcador (BioRad, EEUU).

2. 1. 3. Detección de la quinasa de soja responsable de la fosforilación de NopP.

Con el fin de tratar de identificar la quinasa que fosforila al efector NopP de *S. fredii* HH103 se realizaron ensayos de fosforilación en gel. Para ello se utilizó la misma metodología y condiciones que se detallan en el **apartado 1. 1. 3. del bloque III de Resultados**, descrito para la identificación de la quinasa que fosforila a NopL. En la **Figura 78, A** se observan dos bandas fosforiladas. La banda de mayor tamaño, de aproximadamente 75 kDa, presentó una señal intensa de fosforilación. La otra banda, de alrededor de 68 kDa, mostró una intensidad de la señal muy inferior a la anterior. Sin embargo, ambas se extrajeron del gel y se procesaron para su posterior secuenciación mediante la técnica LC-MALDI-MS/MS.

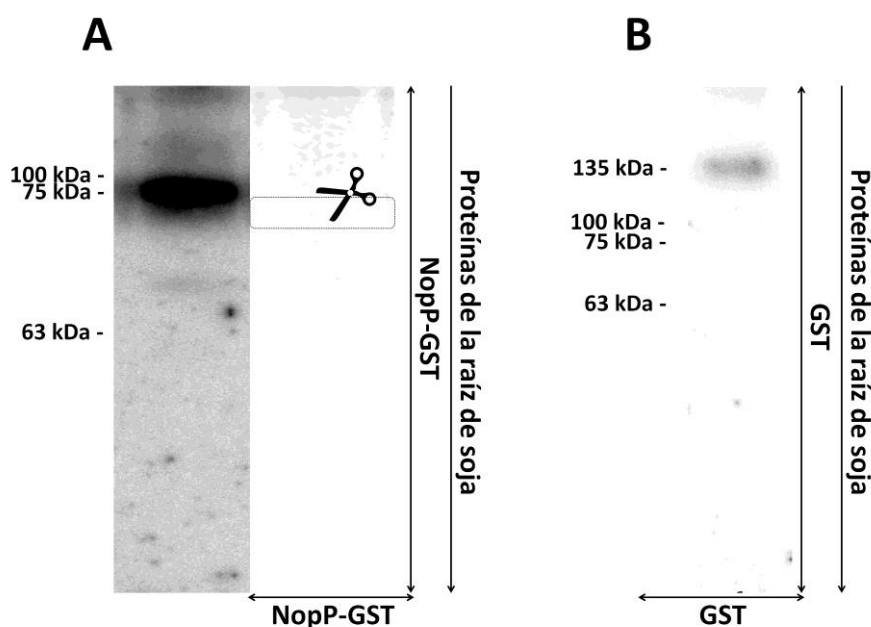


Figura 78. Ensayo de fosforilación “en gel”. **A**, ensayo con la proteína NopP. La imagen de la derecha corresponde con el gel gemelo teñido con azul de Coomassie (las proteínas del extracto de la raíz de soja no se aprecian con claridad debido a que la concentración que se cargó en cada pocillo fue muy baja). **B**, Control negativo: ensayo con la proteína GST. A la izquierda de cada figura se indican las masas moleculares (kDa) del marcador (gTPbio, gTPbio.com).

A partir de las proteínas resultantes de la secuenciación (**Anexo 2**), cuyos parámetros se encontraron dentro de los considerados como significativos, no se identificó ninguna quinasa. Por otro lado, se realizó una comparación de los péptidos resultantes de la

secuenciación frente al genoma de soja debido a la constante incremento de información sobre las funciones de los genes de esta planta (**Tabla 22**).

Tabla 22. Proteínas de soja Williams resultantes de la comparación de los péptidos provenientes de la secuenciación de las proteínas de las bandas de aproximadamente 75 y 68 kDa del ensayo de fosforilación “en gel” (**Figura 78**).

Banda de ~ 75 kDa (<i>G. max</i>)	Número de acceso
5-metil-tetrahidropteróil triglutamato homocisteína metiltransferasa 1	XP_003554033

Banda de ~ 68 kDa (<i>G. max</i>)	Número de acceso
Fructoquinasa de tipo 2	XP_003541157
Fosfoglicerato mutasa independiente de 2,3-bifosfoglicerato	XP_003534616
Malato deshidrogenasa de tipo citoplasmática	NP_001243291
Proteína no caracterizada LOC100500685	NP_001237941

El análisis de la secuenciación de las proteínas de la banda de mayor tamaño, en la que se observó la señal de mayor intensidad, dio lugar a la identificación de una sola proteína, de tipo metiltransferasa. Este hecho puede deberse a que la técnica que se utilizó es efectiva para secuenciar las proteínas más abundantes de la muestra y de esta forma enmascara el resto de las proteínas presentes en la misma, entre las cuales podría encontrarse la quinasa responsable de la fosforilación de NopP. Entre las proteínas identificadas en el ensayo solo se encontró una quinasa, procedente de la secuenciación de la banda de menor tamaño, una fructoquinasa de tipo 2. Los azúcares suponen un componente crítico en el metabolismo de la célula y estos productos, fruto de la fotosíntesis, intervienen en casi todos los procesos de la célula vegetal. Además, son importantes señales que intervienen entre el estatus metabólico y en la inducción de diversos estreses de origen biótico o abiótico (**Lastdrager et al., 2014**). De esta manera, las proteínas de tipo fructoquinasa, cuyo sustrato de fosforilación es la fructosa, sirven como parte de la maquinaria que censa los niveles de estos azúcares (**Smeekens y Hellmann, 2014**).

2. 2. La proteína NopP de *S. fredii* HH103 se localiza en el núcleo y en el citoplasma de la célula hospedadora.

Para determinar la localización del efector NopP en la célula eucariota las células epidérmicas de las hojas de la planta *N. benthamiana* se transformaron con la estirpe *A. tumefaciens* CV3101 (pMUS1252) para poder expresar la proteína NopP fusionada a la proteína fluorescente amarilla o YFP (NopP-YFP). El gen *nopP* se amplificó con los cebadores attB1nopP y attB2nopPsinstop (**Tabla 5**) que contienen las secuencias necesarias para la clonación del amplicón mediante el sistema Gateway (Invitrogen, EEUU). El producto de PCR de 0,8 kb se analizó mediante secuenciación y se clonó en el plásmido pDONR207 generando la construcción pMUS1238. Posteriormente, el gen *nopP*, subclonado en este plásmido, se clonó en el vector para la transformación de plantas pEG101, fusionándose al gen que codifica para la YFP y generándose el plásmido pMUS1252.

Para confirmar que las células de las hojas de *N. benthamiana* expresaban de forma transitoria la proteína de fusión NopP-YFP se realizó un ensayo de inmunodetección en el que se utilizó un anticuerpo específico que reconoce el epitopo HA (Cell Signalling Technology, EEUU), ya que éste se coexpresa junto a la proteína de fusión NopP-YFP y se encuentra situado en su extremo carboxilo. Además, se incluyeron los extractos proteicos de hojas de *N. benthamiana* transformadas con las estirpes que se usaron como control negativo y positivo en los ensayos de microscopía confocal: CV3101 (pEG100), que no expresa la YFP, y CV3101 (pEG104), que sí expresa la YFP, aunque ninguna de estas dos estirpes expresan el epitopo HA. En ambos casos no se observó señal en el *Western-blot*, pero sí en el carril que corresponde al extracto de hojas de *N. benthamiana* en las que se expresó la proteína de fusión NopP-YFP (**Figura 79**).

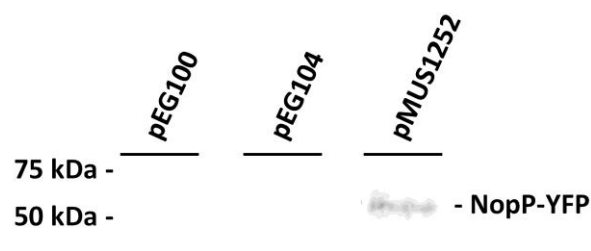


Figura 79. Inmunodetección de la proteína NopP. Las proteínas de cada carril provienen de hojas transformadas con las estirpes CV3101 (pEG100), CV3101 (pEG104) y CV3101 (pMUS1252) de *A. tumefaciens*. A la derecha de la imagen se indica la banda correspondiente a la proteína NopP-YFP ya la izquierda las masas moleculares (kDa) del marcador (BioRad, EEUU).

La **Figura 80** muestra que la proteína NopP se localizaba tanto en el citoplasma como en el núcleo de la célula eucariota y, al igual que ocurrió en el caso del efector NopL, se observó en el núcleo en focos localizados (**Figura 81**).

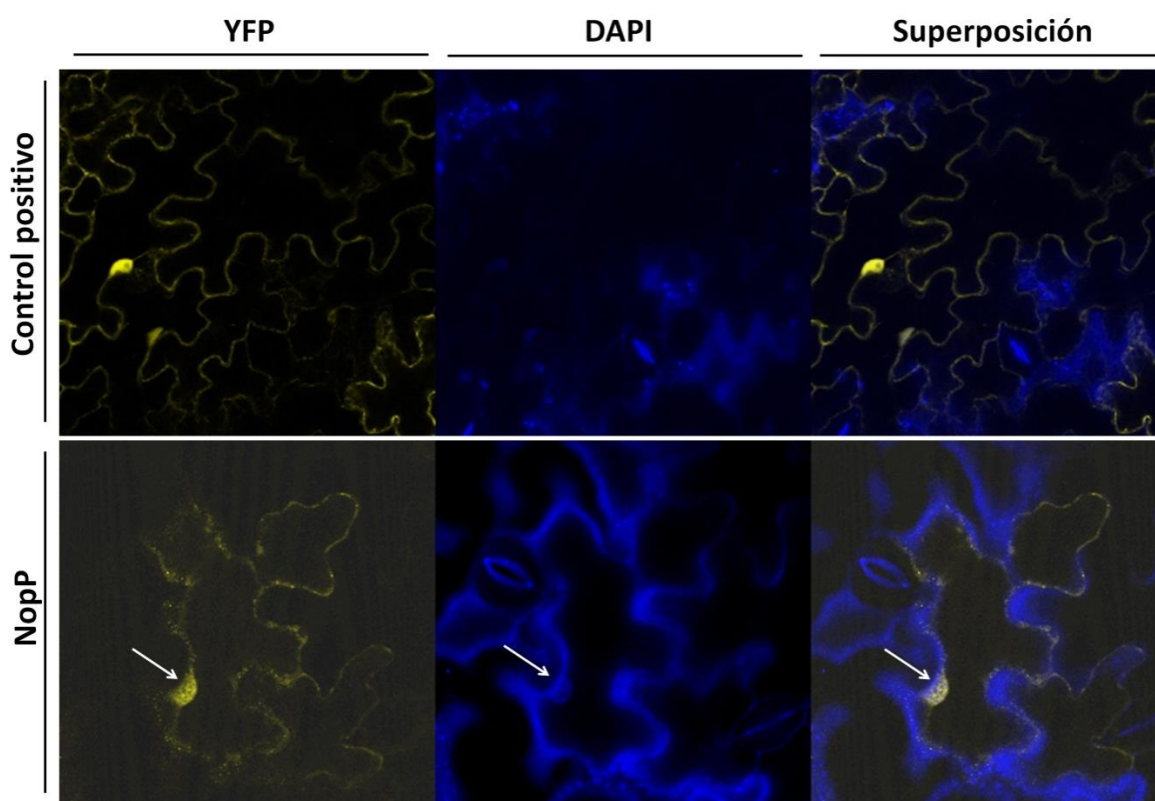


Figura 80. Localización de la proteína NopP en el núcleo y el citoplasma de la célula foliar de *N. benthamiana*. Las flechas de color blanco indican la localización de NopP-YFP en el núcleo y/o la posición de éste. Se realizaron 3 ensayos independientes en los que se analizaron 3 hojas de cada planta.

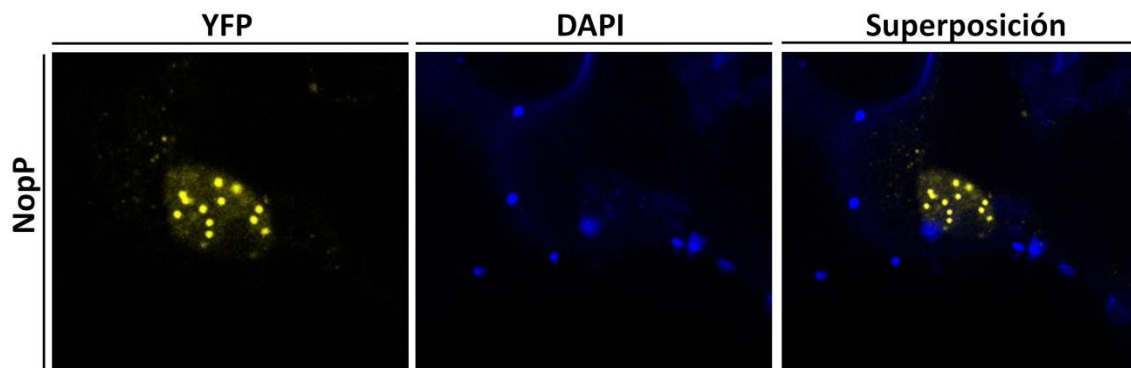


Figura 81. Localización de la proteína NopP en el núcleo de la célula foliar de *N. benthamiana*.

2. 3. Estudios para la identificación de la función del efector NopP de *S. fredii* HH103 en la célula eucariota.

2. 3. 1. Determinación de posibles dianas conservadas en células eucariotas para identificar la función de NopP mediante el uso de un *array* de levaduras.

Para intentar identificar la función biológica del efector NopP de *S. fredii* HH103, al igual que NopL, se utilizó la técnica desarrollada por **Bossis *et al.* (2011)** (**apartado 3. 5. de Material y Métodos**). Para ello, el gen *nopP* de *S. fredii* HH103 se amplificó por PCR con los cebadores *nopP_pGML10_F* y *nopP_pGML10_R* (**Tabla 5**) y el amplicón se clonó en el vector de expresión pGML10, generando el plásmido pMUS1184. El plásmido se transformó en cada una de las estirpes del *array* y se observó que la expresión de NopP afectaba al crecimiento de las estirpes de levadura mutadas en los genes *dep1*, *ccr4*, *csm3*, *chs1*, *bub3* y *alg5* (estirpes hipersensibles al efector). Posteriormente, se analizaron los genes congruentes para NopP. Ya que un gen se define como congruente con un efector determinado si el conjunto de interacciones SL solapa con las estirpes hipersensibles para ese efector, se analizaron todos los genes que fueron sintéticos letales con alguna de las estirpes hipersensibles para el efector en estudio (**Tabla 23**) y mediante los análisis probabilísticos pertinentes se determinó que tanto *taf1*, como *bim1* y *cik1* son genes congruentes para el efector estudiado.

Tabla 23. Determinación de los genes de *S. cerevisiae* congruentes para NopP.

Gen	Solapamientos SL	Total	<i>dep1</i>	<i>ccr4</i>	<i>esm3</i>	<i>chs1</i>	<i>bub3</i>	<i>alg5</i>	Valor- <i>p</i> *	Puntuación
<i>taf1</i>	4	27	1	1		1	1		5,05E-07	6,3
<i>bim1</i>	4	29	1	1	1		1		6,82E-07	6,17
<i>cik1</i>	3	13		1	1		1		5,17E-06	5,29
<i>kar3</i>	3	23		1	1		1		3,16E-05	4,5
<i>cln2</i>	2	5		1		1			8,52E-05	4,07
<i>stb5</i>	2	5	1	1					8,52E-05	4,07
<i>srb2</i>	2	6	1	1					1,28E-04	3,89
<i>soh1</i>	2	7	1	1					1,78E-04	3,75
<i>sic1</i>	2	8		1			1		2,38E-04	3,62
<i>lsm7</i>	2	8		1	1				2,38E-04	3,62
<i>lsm6</i>	2	8		1			1		2,38E-04	3,62
<i>nat1</i>	2	9	1	1					3,05E-04	3,52
<i>lsm1</i>	2	9		1			1		3,05E-04	3,52
<i>mrc1</i>	2	10			1		1		3,81E-04	3,42
<i>spt3</i>	2	11	1	1					4,65E-04	3,33
<i>vps72</i>	2	11	1				1		4,65E-04	3,33
<i>yke2</i>	2	11			1		1		4,65E-04	3,33
<i>vps71</i>	2	12	1				1		5,57E-04	3,25
<i>rad50</i>	2	12	1	1					5,57E-04	3,25
<i>cdc73</i>	2	15	1	1					8,82E-04	3,05
<i>arp6</i>	2	15	1				1		8,82E-04	3,05
<i>ctf8</i>	2	16			1		1		1,01E-03	3
<i>arp1</i>	2	16		1			1		1,01E-03	3

* El valor *p* deriva de la distribución hipergeométrica y se calculó de acuerdo con **Kramer et al. (2007)**. La puntuación hace referencia a la congruencia de cada gen con NopL y se define como el logaritmo negativo en base 10 del valor *p*.

Los genes congruentes se estudiaron mediante la aplicación web “FuncAssociate 2.1” para identificar los procesos celulares más probables en los que el efector pudiese estar implicado. De esta forma, se determinó que NopP podría estar involucrado en los procesos celulares que se llevan a cabo en el núcleo de la célula hospedadora, relacionándose su migración al núcleo de la célula con el transporte a través del citoesqueleto (**Tabla 24**).

Tabla 24. Análisis de los procesos celulares a través de “FuncAssociate 2.1” usando los genes congruentes para NopP.

N	X	LOD	P	P_adj	Identidad del proceso celular	Procesos celular
2	17	2,831	2,04E-05	0,014	GO:0005881	Microtúbulo citoplasmático
2	20	2,754	2,84E-05	0,014	GO:0010970	Transporte basado en microtúbulos
2	20	2,754	2,84E-05	0,014	GO:0030473	Migración nuclear a través de microtúbulos
2	20	2,754	2,84E-05	0,014	GO:0030705	Transporte intracelular a través del citoesqueleto
2	20	2,754	2,84E-05	0,014	GO:0072384	Transporte de orgánulos a través de microtúbulos
2	23	2,689	3,79E-05	0,018	GO:0007018	Movimiento basado en microtúbulos
2	24	2,669	4,13E-05	0,021	GO:0007097	Migración nuclear
2	24	2,669	4,13E-05	0,021	GO:0040023	Establecimiento de la localización nuclear
2	26	2,632	4,86E-05	0,026	GO:0006928	Movimiento del componente celular
2	37	2,470	9,95E-05	0,034	GO:0005819	Huso

N, número de entidades cuestionadas que tiene la cualidad de la fila. X, número total de entidades que tiene la cualidad de la fila. LOD, logaritmo en base 10 de la probabilidad de que un proceso celular se relacione con los genes congruentes para un efector. P, valor *p*. P-adj. Valor *p* ajustado a partir del remuestreo.

2. 3. 2. Identificación de proteínas que interaccionan con NopP en hojas de la planta modelo *Nicotiana benthamiana*.

Para conocer qué proteínas vegetales podrían interaccionar con NopP de HH103 se realizó un ensayo de inmunoprecipitación. Para ello, NopP se expresó de forma transitoria en las hojas de *N. benthamiana* que se transformaron con la estirpe *A. tumefaciens* CV3101 (pMUS1252). Las proteínas co-inmunoprecipitadas con NopP, es decir, aquellas que podrían interaccionar con el efector NopP, se secuenciaron y se obtuvieron una serie de candidatos que se encuentran recogidos en la **Tabla 25**. Estas proteínas provienen de una selección basada en la aparición de la proteína en las muestras analizadas, no identificada en el control negativo, además de encontrarse

altamente representada en cuanto a número de péptidos y no relacionarse con los procesos que ocurren en el cloroplasto.

Tabla 25. Secuenciación de las proteínas del extracto de hojas de *N. benthamiana* que interaccionan con la proteína NopP, procedentes de los ensayos de inmunoprecipitación.

Número de acceso	Descripción de la proteína (Especie)	AA	kDa	pI
A0A9R6	Histona H4 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	103	11,4	11,47
P46942	Proteína DB10 del tipo helicasa de ARN dependiente de ATP (<i>Nicotiana sylvestris</i>)	607	65,9	9,51
O23826	Proteína relacionada con quinesina de 125 kDa (<i>Nicotiana tabacum</i>)	1006	113,6	5,81
C1K125	Proteína de resistencia (quinasa) (<i>Nicotiana repanda</i>)	166	18,3	8,87
Q95DV4	NADH deshidrogenasa, subunidad ND1 (<i>Nicotiana tomentosiformis</i>)	158	18,1	6,67
Q9FVE9	Aconitato hidratasa (<i>Nicotiana tabacum</i>)	898	98,0	6,29
G5ELZ3	Ciclofilina 40 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	362	40,3	6,67
Q93YE1	Proteína de cubierta (<i>Nicotiana tabacum</i>)	70	8,3	5,52
Q9SLX4	Factor Sigma Proteína de cubierta (<i>Nicotiana tabacum</i>)	508	57,4	9,01
Q6JBD8	Proteína tipo N (<i>Nicotiana tabacum</i>)	941	108,3	6,54
A2V6V3	Quinasa de tipo receptor lectina (<i>Nicotiana tabacum</i>)	677	76,2	6,62
Q5M9Y0	Proteína no caracterizada (<i>Nicotiana tabacum</i>)	155	17,9	9,99
Q5VJV0	ACC sintetasa ACS3b (<i>Nicotiana attenuata</i>)	485	54,7	6,47
A0A076FN02	GRAS2 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	583	65,2	7,42
Q93XN0	Sununidad α de la CK2 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	333	39,4	8,10

Se realizaron dos réplicas de este ensayo y se incluyeron únicamente las que se detectaron en ambas réplicas y las que no se encuentran relacionadas con los procesos que ocurren en el cloroplasto, además de descartar aquellas que se unieron a la inmunoglobulina G (IgG) o a la resina, usado como control negativo del método. **AA**, aminoácidos. **pI**, punto isoelectrico.

La secuenciación de las proteínas de origen vegetal que co-inmunoprecipitaron con NopP dio lugar a la identificación de proteínas relacionadas con los ácidos nucleicos (histona H4 o proteína DB10 del tipo helicasa de ARN dependiente de ATP), así como proteínas relacionadas con la inmunidad en plantas [ciclofilina 40, una proteína de resistencia (quinasa) o GRAS2] u otras de menor interés relacionadas con el metabolismo (**Tabla 25**).

A partir de los resultados obtenidos en este apartado se pueden destacar las siguientes conclusiones:

NopP de *S. fredii* HH103 se encuentra localizada fundamentalmente en el núcleo de la célula hospedadora y, al igual que NopL, se encuentra incluida en focos nucleares.

NopP de *S. fredii* HH103 es fosforilada por una quinasa de la raíz de la soja. La quinasa responsable es de tipo serina/treonina y tirosina quinasa y es dependiente de calcio.

NopP de *S. fredii* HH103 podría interaccionar con proteínas relacionadas con los ácidos nucleicos y/o proteínas involucradas en el sistema inmune.

Discusión

Las plantas interactúan con un gran número de microorganismos en sus hábitats naturales. La simbiosis establecida entre las leguminosas y los rizobios resulta en la formación de los nódulos en las raíces de las plantas donde el nitrógeno atmosférico es fijado por la bacteria. Esta asociación simbiótica presenta un alto grado de especificidad por parte de ambos componentes de la relación y, en el caso de las plantas hospedadoras, no solo se da a nivel de Familia, sino también a nivel individual de especie o variedad (**Yang et al., 2010**). De esta forma, un determinado grupo de leguminosas solo es capaz de nodular con un conjunto restringido de especies o de estirpes bacterianas, estableciéndose así el denominado rango de hospedador.

La especificidad desarrollada evolutivamente en la relación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa se encuentra regulada por un intercambio muy complejo de señales entre los dos componentes de la simbiosis. Como consecuencia, se han establecido múltiples mecanismos para en el reconocimiento de los rizobios por parte de la leguminosa hospedadora y viceversa. Hasta la fecha, los estudios desarrollados sobre esta cuestión han demostrado que los rizobios sintetizan una serie de moléculas que actúan de forma específica sobre el rango de hospedador, como son los factores Nod, los polisacáridos superficiales o las proteínas secretadas a través del T3SS (**Fraysse et al., 2003; Gage, 2004; Minami et al., 1996; Viprey et al., 1998**). Sin embargo, los mecanismos que controlan esta especificidad por parte de las leguminosas no han sido estudiados aún en profundidad, aunque durante los últimos años parece haber cobrado una mayor relevancia.

Entre los componentes relacionados con el control de la especificidad de nodulación en las plantas leguminosas se encuentran los receptores (NFR, del inglés, Nod Factor Receptors) que reconocen a los factores Nod. Además, las plantas también disponen de las proteínas R, codificadas por los genes *Rj2* o *Rfg1* (alelos de un mismo locus), *Rj3* y *Rj4*. Estas proteínas actúan como receptores de los efectores secretados a través del T3SS de los rizobios. En algunos casos, el reconocimiento específico de ciertos efectores de rizobios por estas proteínas R desemboca en un bloqueo total de la nodulación (**Hayashi et al., 2012; Yang et al., 2010**). Así, *B. elkanii* USDA122 no es capaz de nodular la variedad Hardee de soja, que presenta el gen *Rj2*, y algunas estirpes de *S. fredii*, como USDA257, son incapaces de nodular las variedades de soja americanas (presentan el gen *Rfg1*) (**Meinhardt et al., 1993; Tsukui et al., 2013**).

El T3SS es utilizado por una gran variedad de microorganismos para inyectar efectores al interior de la célula hospedadora. Cada especie o estirpe bacteriana secreta un determinado conjunto de efectores que manipulan las rutas de señalización involucradas en los mecanismos de defensa para así superar la respuesta inmune. Debido al papel crucial que este sistema ejerce sobre la inducción de la enfermedad en microorganismos patógenos, los estudios sobre la estructura y función del T3SS se han centrado en este tipo de bacterias. Sin embargo, la secuenciación de los genomas de multitud de microorganismos y la gran conservación que caracteriza a las proteínas que conforman la estructura de la maquinaria de este sistema (**Galán, 2009**) han permitido la identificación del T3SS en otras bacterias, como los rizobios (**Viprey *et al.*, 1998**). En los rizobios, el T3SS no se encuentra en todas las especies estudiadas y no se ha establecido una correlación entre el género bacteriano y la presencia de este sistema de secreción. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que el T3SS de los rizobios es necesario para la determinación del rango de hospedador y para una nodulación efectiva, efectos que dependen básicamente del conjunto de efectores o proteínas Nop secretadas a través de cada T3SS. Así, mientras que en USDA257 la presencia de las proteínas Nop impide la nodulación en las variedades americanas de soja, en HH103 son necesarias para una simbiosis efectiva con las variedades americanas y asiáticas (**Annapurna y Krishnan, 2003; de Lyra *et al.*, 2006**).

Algunos autores indican que el T3SS de los patógenos y los simbioses podría jugar un papel similar en los procesos de patogénesis y simbiosis, respectivamente (**Deakin y Broughton, 2009; Soto *et al.*, 2009**). Sin embargo, hasta la fecha, las respuestas de defensa que generan los rizobios en las plantas hospedadoras han sido descritas como leves y transitorias. Los estudios realizados por **López-Baena *et al.* (2009)** revelaron que el reconocimiento por la planta de soja de alguna MAMP producida por la estirpe HH103 de *S. fredii* activa una respuesta de defensa que, en ausencia de un T3SS funcional, llega a ser sistémica, ya que se observa la inducción de la transcripción del gen *GmPRI* primero en raíces y unos días más tarde también en hojas. Además, estos autores demostraron que el T3SS es el responsable de la supresión de estas respuestas, al igual que ocurre en los microorganismos patógenos. Estos resultados se utilizaron para establecer el principal objetivo de esta Tesis, que es el estudio de la respuesta de defensa inducida por la estirpe HH103 en soja Williams y el papel del T3SS en la supresión de la misma.

Para determinar en qué momento del proceso de infección la inactivación del T3SS de HH103 afecta negativamente a la nodulación en soja Williams, se analizó el proceso simbiótico durante los primeros 30 días mediante una cinética de nodulación. Este experimento mostró una reducción significativa en la formación de los nódulos y un retraso en la aparición de los primeros nódulos en aquellas plantas que fueron inoculadas con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* con respecto a las plantas inoculadas con la estirpe silvestre HH103 (**Figura 13**). Con el objetivo de comprobar si el T3SS afecta la expresión de genes relacionados con la infección y la nodulación en soja, se realizó un análisis de la expresión de los genes *NIN* y *ENOD40*, asociados con el desarrollo y el mantenimiento del tubo de infección y la formación de los nódulos, respectivamente (**Geurts et al., 2005; Marsh et al., 2007**). Los resultados mostraron una mayor transcripción de estos genes en las plantas inoculadas con la estirpe silvestre HH103 con respecto a aquellas que fueron inoculadas con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* (**Figuras 17 y 18**). Para explicar estos resultados se plantearon dos posibles hipótesis. Por un lado, el conjunto de efectores secretados a través del T3SS podría suprimir las respuestas de defensa activadas en la planta, fruto del reconocimiento de alguna MAMP del rizobio que se da durante la simbiosis muy temprana. Por otro lado, debido a los recientes estudios de **Okazaki et al. (2013)** se planteó la posibilidad de que el T3SS podría promover una inducción parcial de la expresión de estos genes de forma directa (vía independiente de los factores Nod), y no mediante la atenuación de las respuestas de defensa de la planta. Estos autores describieron que el T3SS de *B. elkanii* USDA61 puede suplantar la señalización de los factores Nod, induciendo la expresión de los genes de nodulación temprana de las plantas de soja y la formación de nódulos (más del 30% del número de nódulos por planta con respecto a la estirpe silvestre). Esto sugiere que el T3SS de *B. elkanii* USDA61 juega un papel importante en la nodulación en las infecciones que se producen a través de las vías independientes de los factores Nod, mediante rotura (o *crack entry*) o de forma intercelular.

En el caso de la estirpe HH103, como en la mayoría de las relaciones simbióticas, los factores Nod son esenciales para la nodulación en la soja y la infección se da a través de los pelos radicales. Además, el T3SS de *B. elkanii* USDA61 se encuentra incluido dentro del grupo de los T3SS no canónicos, debido a la regulación y la organización génica tan particular que presenta el sistema (**Tampakaki, 2014**), por lo que no sería conveniente extrapolar los resultados obtenidos mediante el uso de esta estirpe al resto

de modelos *Rhizobium*-leguminosa. De hecho, en esta estirpe, la secreción de Nop es independiente de flavonoides y parece ser estas proteínas son secretadas de forma constitutiva. Aún así, para descartar esta hipótesis, se realizaron ensayos de nodulación con plantas de soja Williams inoculadas con una estirpe que posee un alto número de copias del gen que codifica el regulador transcripcional *ttsI* sobre un fondo genético mutante en *nodD1* (incapaz de sintetizar factores Nod y, por tanto, de responder a los flavonoides, e incapaz de secretar proteínas Nop). Estos experimentos demostraron que la estirpe HH103 *nodD1::Ω (ttsI)* puede inducir la formación de nódulos en plantas de soja a través de la acción del T3SS independientemente de los factores Nod. Sin embargo, el número de nódulo fijadores formados fue muy bajo (alrededor de un 90% menos que la estirpe silvestre) y, además, no todas las plantas ensayadas fueron capaces de nodular (**Tabla 26**). Todos estos resultados indican que el efecto descrito del T3SS por **Okazaki et al. (2013)** no es el principal motivo de la menor expresión de los genes *NIN* y *ENOD40* en la raíz de soja Williams inducida por la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* con respecto a la estirpe parental HH103.

Tabla 26. Respuesta a la inoculación de soja Williams con las estirpes *S. fredii* HH103, HH103 *nodD1::Ω*, HH103 *nodD1::Ω (ttsI)*, HH103 *nodA::Tn5-lacZ* y HH103 (*ttsI*).

Estirpe inoculada	Ensayo 1			Ensayo 2		
	Plantas ensayadas	Plantas noduladas	Nódulos/Planta nodulada	Plantas ensayadas	Plantas noduladas	Nódulos/Planta nodulada
Sin inocular	6	0	0	6	0	0
HH103	6	6	46,3 ± 19,8	10	10	52,1 ± 12,6
HH103 <i>nodD1::Ω</i>	6	0	0	6	0	0
HH103 <i>nodD1::Ω (ttsI)</i>	6	4	4,25 ± 2,06*	10	4	6,5 ± 7,4*
HH103 <i>nodA::Tn5-lacZ</i>	6	0	0	6	0	0
HH103 (<i>ttsI</i>)	6	6	63,83 ± 20,62	10	10	61,16 ± 17,03

Los valores se tomaron 6 semanas después de la inoculación. Las bacterias aisladas de los nódulos formados por cada inoculante mostraron los marcadores de resistencia esperados. Los valores del número de nódulos por planta de la estirpe HH103 *nodD1::Ω (ttsI)* se compararon individualmente con los de la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los números de la misma columna seguidos de un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha = 5\%$.

Hasta el momento, los resultados obtenidos mostraron que existía una reducción del número de nódulos, un retraso en su aparición y una menor expresión de los genes de nodulación en las raíces de soja Williams inoculadas con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* con respecto a las inoculadas con la estirpe parental. Para estudiar si los efectos observados son debidos a la respuesta de defensa activada en la planta de soja tras el reconocimiento del rizobio y a la supresión de estos mecanismos de defensa por el T3SS, se realizaron numerosos ensayos relacionados con los diferentes mecanismos de defensa activados por los organismos fitopatógenos en sus plantas hospedadoras. Entre estas respuestas se estudiaron la producción de depósitos de calosa, la producción de ROS, los cambios en la expresión de genes relacionados con la defensa, los cambios en el balance hormonal y la activación de una respuesta de defensa sistémica.

El reconocimiento de los MAMP suele inducir rápidamente la producción de depósitos de calosa, que se acumulan en el lugar de penetración del patógeno y tiene como finalidad el desarrollar una barrera física para evitar la colonización y dispersión del patógeno (Aist y Bushnell, 1991; He *et al.*, 2007; Millet *et al.*, 2010). La acumulación de calosa en las células epidérmicas de la raíz de soja Williams se estudió como una de las primeras aproximaciones para determinar si HH103 y sus derivados son capaces de activar las respuestas de defensa en soja. De esta forma se observó que tanto la estirpe silvestre HH103 como los mutantes derivados HH103 *ttsI::Ω* y HH103 *nodA::Ω* (incapaz de producir factores Nod) indujeron la acumulación de un número de depósitos de calosa similar en las raíces de soja entre los diferentes tratamientos (Figura 22). Estos resultados parecen indicar que el reconocimiento del rizobio por parte de la planta activa este mecanismo de respuesta de defensa, que no depende ni de los factores Nod, ni de la estructura y ni de los efectores del T3SS.

Durante la patogénesis, el reconocimiento de las MAMP puede dar lugar a la producción de ROS. Estos compuestos se suelen acumular rápidamente durante la HR en un proceso llamado estrés oxidativo. Entre sus funciones se encuentran la de eliminar a los microorganismos, reforzar la pared celular e inducir la expresión de los genes relacionados con la respuesta de defensa. Sin embargo, en el caso de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, la producción de ROS, especialmente el peróxido de hidrógeno, no solo tiene una función antimicrobiana, sino que también son necesarias para la organogénesis del nódulo, jugando un papel importante tanto en los primeros estadios

de la simbiosis como en la promoción del crecimiento de los pelos radicales (Apel y Hirt, 2004; Monshausen *et al.*, 2007; Neill *et al.*, 2002; Puppo *et al.*, 2013).

Para determinar los niveles de ROS producidas en las raíces de soja en respuesta a la inoculación con HH103 y el mutante afectado en el T3SS durante los primeros estadios de la nodulación, se cuantificó la actividad catalasa y la expresión de genes que codifican enzimas peroxidasas, ambos parámetros relacionados directamente con los niveles de peróxido de hidrógeno. Además, se midieron los niveles de MDA como indicador del daño producido por la producción y acumulación de ROS en los tejidos.

En general, el reconocimiento de la estirpe HH103 y del mutante HH103 *ttsI::Ω* desencadenó la producción de ROS (actividad catalasa) rápidamente (2 h.p.i.), sin observarse diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 24, A). Algunos autores indican que las ROS pueden formar parte de una respuesta de defensa para limitar la infección por el simbionte. Así se evitaría la entrada de un gran número de bacterias o de otras especies no compatibles, como han demostrado diversos trabajos en los que se produce una respuesta HR en interacciones *Rhizobium*-leguminosa (Parniske *et al.*, 1990; Santos *et al.*, 2001; Vasse *et al.*, 1993). Con el paso del tiempo los niveles de ROS (expresión de los genes que codifican para peroxidasas, actividad catalasa y cuantificación de MDA) presentaron diferencias entre los tratamientos, siendo la acumulación mayor en las raíces inoculadas con la estirpe silvestre HH103 con respecto a las inoculadas con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* [Figuras 23, 24, (A, B y C) y 25]. El patrón diferencial en la producción de ROS entre la estirpe silvestre y el mutante se correlaciona positivamente con los niveles de expresión de los genes indicadores del proceso de nodulación, *NIN* y *ENOD40* (Figuras 17 y 18). Estos resultados están en concordancia con los estudios en los que se sugieren que las ROS son moléculas necesarias para la formación y progresión del tubo de infección o son señales requeridas para la activación de diversos genes de la planta y/o el rizobio (Chang *et al.*, 2009; Saeiki, 2011; Soto *et al.*, 2011).

La deposición de calosa y la producción de ROS son respuestas defensivas bien conocidas y son comunes en las plantas infectadas por patógenos e, incluso por bacterias simbiotes. Sin embargo, existen otros tipos de respuestas que principalmente se han descrito en las relaciones patogénicas, como es el caso de la producción de SA y la activación del gen *PR1*, procesos íntimamente ligados a la resistencia SAR (Wang *et*

al., 2005). En el caso de las relaciones simbióticas y de la interacción de las plantas con PGPR, se ha demostrado que el reconocimiento de este tipo de microorganismos pueden desencadenar en la planta una resistencia similar, llamada ISR. Sin embargo, los mecanismos que desembocan en la ISR no dependen de SA y no se encuentran asociados con la acumulación de proteínas PR (Van Loon y Strein, 1999).

Aunque estas diferencias se han establecido en los últimos años, la información sobre las respuestas de defensa relacionadas con la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es muy escasa. Además, López-Baena *et al.* (2009) demostraron que el reconocimiento de la estirpe HH103 por la soja activa la transcripción del gen *GmPR1* y que el T3SS suprime esta respuesta. El gen *GmPR1* codifica la proteína PR1 y su activación es dependiente de SA (Mazarei *et al.*, 2007). Por este motivo, se decidió realizar la cuantificación de la expresión de este gen y de la concentración de SA y así poder dilucidar si el reconocimiento de la estirpe simbiote HH103 dispara en la planta de soja una respuesta similar a la producida en el caso de las relaciones patogénicas y estudiar el papel del T3SS en la supresión de esta respuesta.

Los resultados obtenidos mostraron que el gen *GmPR1* presentaba un pico de expresión máximo a los 2 d.p.i. en las plantas que fueron inoculadas con la estirpe parental HH103, reduciéndose estos valores con el tiempo hasta ser similares al control sin inocular. Sin embargo, en las plantas inoculadas con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* el gen *GmPR1* se expresó más que el control en todo momento, llegando a su máxima expresión a los 4 d.p.i. (Figura 31). Para comprobar si los niveles de expresión de este gen se correlacionan con los cambios en la producción de SA, se determinó la concentración de la hormona en las raíces de las plantas de soja Williams. La metodología que suele utilizarse para la extracción de SA resulta un proceso costoso, a nivel económico y de tiempo, y la cuantificación química de esta hormona requiere laboratorios especializados. Por esta razón, se decidió utilizar en primer lugar el biosensor *Acinetobacter*sp. ADP1_ *lux*, que ya había sido usado con anterioridad para la cuantificación de SA en las hojas de tabaco y que está considerado como un método eficaz, sencillo, rápido y de bajo coste (Huang *et al.*, 2006).

La utilización del biosensor para la cuantificación de SA reveló que la inactivación del gen *ttsI* causaba un incremento de la concentración de SA en las raíces y las hojas de soja Williams con respecto a las plantas control sin inocular y a las inoculadas con la

estirpe parental HH103 (**Figura 26**). Esta primera aproximación permitió descartar aquellos tratamientos que no afectaban a la producción de SA, facilitando la validación de la cuantificación de esta hormona mediante HPLC solo para aquellos tratamientos que fueron relevantes y así reducir el coste económico del estudio. Posteriormente, los resultados sobre la producción de SA mediante la utilización del biosensor se validaron mediante HPLC, obteniéndose resultados similares (**Figura 27**). Por lo tanto, el protocolo descrito detalladamente en esta Tesis demuestra que el uso del biosensor podría ser una buena herramienta para la determinación de la concentración de SA en las raíces de las plantas, especialmente en los estudios relacionados con las interacciones planta-patógeno, en los cuales las respuestas de defensa inducidas por un patógeno sobre la planta son más fuertes.

Además, los análisis realizados mediante HPLC mostraron que el pico temprano de expresión del gen *GmPRI* en las plantas inoculadas con la estirpe silvestre HH103 a los 2 d.p.i. podría estar relacionado con el previo incremento de la producción de SA que se produjo a las 2 h.p.i. en las plantas inoculadas con la misma estirpe y no con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* (**Figuras 27 y 31**). Esta rápida producción de SA inducida por la estirpe silvestre HH103 podría deberse a la presencia de una o más moléculas dependiente/s de TtsI que actúe/n como MAMP, activando las respuestas de defensa relacionadas con la MTI. Entre los candidatos a esta/s molécula/s podrían encontrarse las flagelinas, u otras moléculas secretadas a través del T3SS, e incluso las proteínas que conforman el *pilus* del T3SS. Por otro lado, este efecto podría deberse a los productos de degradación de la pared celular vegetal que se generan durante la inserción del *pilus* en la célula hospedadora (DAMP). Los genes *gunA* y *gunA2*, presentes en el cromosoma de *B. japonicum* USDA110, codifican enzimas endogluconasas, actividad responsable de la degradación de la pared celular eucariota. Además, el gen *gunA* también se ha identificado en la estirpe HH103 de *S. fredii*, presentando en su región promotora una caja *tts* (**Vinardell et al., 2015**), por lo que es posible que esta proteína sea secretada a través del T3SS. Con todo ello, GunA podría ser la proteína dependiente de TtsI responsable de la degradación de la pared eucariota para la inserción del *pilus*, lo que causaría la producción de DAMP y, consecuentemente, la activación de las respuestas relacionadas con la MTI.

Los resultados descritos sobre el efecto del SA en la nodulación dependen de la concentración del SA aplicado, así como de la especie de leguminosa, el método de

aplicación y las condiciones de crecimiento usadas (**Ferguson y Mathesius, 2014**). Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados con soja indican que el SA posee un efecto negativo sobre la nodulación, causando una reducción del número de nódulos y afectando al desarrollo de la planta (**Lian et al., 2000; Sato et al., 2002**). Los estudios realizados en esta Tesis mostraron que la adición exógena de SA directamente sobre la solución nutritiva de las plantas propicia la activación de la expresión del gen *GmPRI* en las raíces de soja Williams. Además, el SA exógeno afectó al número de nódulos, reduciéndose significativamente con respecto al control sin tratar (**Figura 35 y Tabla 13**). Estos resultados se encuentran en concordancia con los descritos anteriormente y con aquellos en los que se expresó de forma transgénica el gen que codifica la enzima NahG en plantas que desarrollan nódulos determinados (*L. japonicus*) e indeterminados (*M. truncatula*). Ya que la NahG posee actividad salicilato hidrolasa, actuando sobre la degradación del ácido salicílico hacia piruvato y acetyl CoA, se consiguió reducir el contenido de SA endógeno. Con ello se observó un incremento en la formación de los tubos de infección, en el crecimiento de la raíz y en el número de nódulos (**Stacey et al., 2006**).

Algunos efectores de patógenos pueden promover la virulencia influyendo sobre el balance de las fitohormonas a través de la activación de las MAPK. Por ejemplo, el efector AvrB de *P. syringae* actúa en la MTI y en la ETI, a través de la fosforilación de RIN4 y MPK4 para inducir la transcripción de los genes responsables de la síntesis de JA en *A. thaliana* (**He et al., 2004; Cui et al., 2010**). La quinasa MPK4 de soja se considera un regulador negativo de la producción de SA, ROS y de la activación de los genes *PR* en las respuestas de defensa y, por otro lado, se considera un regulador positivo en el crecimiento y desarrollo de la planta (**Liu et al., 2011; 2014**). Aunque la mayoría de las MAPK se encuentran reguladas post-traduccionalmente a través de la activación mediante fosforilación, existen otras MAPK, como WIPK de tabaco, que se inducen a nivel transcripcional en respuesta a diversos estreses y al ataque por patógenos (**Zhang y Klessig, 1998; Zhang et al., 2000**). Por esta razón, se decidió medir la expresión del gen *GmMPK4* en las raíces de soja inoculadas con las estirpes HH103 y el mutante derivado incapaz de secretar proteínas Nop, y estudiar así el papel del T3SS en la defensa. La inoculación de las plantas de soja Williams con la estirpe silvestre HH103 indujo transitoriamente la transcripción del gen *GmMPK4* en las raíces inoculadas a los 2 d.p.i., reduciéndose los niveles de expresión con el tiempo. Por otro

lado, los niveles de transcripción de este gen en las plantas inoculadas con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* fueron similares a los de las plantas control sin inocular, sin embargo, a los 4 d.p.i. la expresión de este gen se redujo considerablemente (**Figura 37**). La expresión diferencial del gen *GmMPK4* se correlaciona con los resultados observados sobre la producción de SA y la expresión del gen *GmPRI* (**Figuras 27, 31 y 37**). Además, estos datos sugieren que los efectores secretados a través del T3SS de HH103 no solo promueven la activación de *GmMPK4*, sino que previenen la represión del gen. De esta forma se consigue evitar el aumento de SA, ROS y la activación de los genes *PR*, y a su vez se promueve el crecimiento y el desarrollo de la planta.

En general, se han descrito dos rutas principales de MAPK involucradas en la defensa de la planta, aunque el efecto sobre la regulación de las respuestas de defensa por cada una de las rutas depende de la especie vegetal. En *A. thaliana*, ambas rutas regulan finalmente la actividad del factor de transcripción WRKY33, perteneciente a la familia de reguladores WRKY y que activa la transcripción de genes relacionados con la defensa. En soja, se han realizado estudios mediante el silenciamiento del gen *GmMPK4*, que codifica para la quinasa MPK4, quinasa que actúa en la ruta MKK1-MKK2/2-MPK4. Los autores observaron a través de este silenciamiento que el gen ortólogo a *WRKY33* de *A. thaliana* se transcribía más que el resto de los genes que codifican los factores de transcripción de la familia WRKY (**Liu et al., 2011**). Este hecho pone de manifiesto la importancia de *WRKY33* en la activación de las respuestas de defensa mediadas por unos bajos niveles de la quinasa MPK4 de soja. En nuestro caso, la inoculación de las plantas de soja Williams con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* indujo transitoriamente la transcripción del gen *GmWRKY33* en las raíces inoculadas a los 8 d.p.i. Sin embargo, estos niveles de expresión no se observaron en las raíces de las plantas inoculadas con la estirpe parental HH103 (**Figura 39**). El balance de expresión de los genes *GmMPK4* y *GmWRKY33* puede correlacionarse debido a su regulación. Así, los efectores del T3SS promovieron a los 2 d.p.i. la expresión del gen *GmMPK4* y previnieron su represión a los 4 d.p.i., para impedir por completo la producción de la quinasa MPK4 y la activación de las respuestas de defensas mediante la activación de la transcripción de *GmWRKY33*. En cambio, los efectos producidos como consecuencia de la ausencia del T3SS mediante la represión de este gen a los 4 d.p.i., se correlacionaron con la activación del gen *GmWRKY33* a los 8 d.p.i. En el caso de las relaciones patogénicas se han descrito efectos similares. Así, la inoculación de

plantas de *A.thaliana* con un mutante del patógeno *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* 14028, que posee un T3SS no funcional, promovió a las 24 horas la expresión de una serie de genes relacionados con la defensa, entre los que se encuentra *WRKY33* (Garcia *et al.*, 2014; Schikora *et al.*, 2011). El momento exacto en el que un rizobio es detectado por los mecanismos de defensa de la planta no se encuentra bien definido debido a los escasos estudios sobre el tema. Por este motivo, el momento de activación de algunos mecanismos de defensa en la relación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa, como la activación del gen *GmMPK4* y *GmWRKY33*, han sido descritos por primera vez en esta Tesis.

Diversos estudios han demostrado que el ET juega un papel negativo en la nodulación, afectando a la formación del tubo de infección, la regulación del número total de nódulos, así como la morfología y la posición de éstos. Sin embargo, los efectos inhibitorios del ET sobre la nodulación en las plantas de soja no están claros, aunque sí se ha determinado que el ET afecta la arquitectura de la raíz de soja (Ferguson y Mathesius, 2014; Schmidt *et al.*, 1999). También se ha descrito que las plantas de soja tratadas con altas dosis de ET desarrollan un engrosamiento del hipocótilo (Hoffman *et al.*, 1999). Estos resultados podrían relacionarse con el fenotipo observado en las raíces de soja Williams inoculadas con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω*, en las que se produjo una drástica interrupción del crecimiento de la raíz principal a los 8 d.p.i. (Figuras 14 y 15). Los resultados obtenidos en esta Tesis mostraron que los niveles de ET observados fueron mayores en las raíces de soja inoculadas con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* respecto a los valores de las inoculadas con la estirpe silvestre, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 30). Por otro lado, los altos niveles de SA se encuentran parcialmente asociados con la deformación y el escaso crecimiento de las plantas de soja (Liu *et al.*, 2011). Es por ello, por lo que los efectos observados sobre la morfología de la raíz inducidos por la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* podrían deberse a la alta producción de SA y/o al leve incremento de ET. Además, como ya se ha comentado, la expresión de *GmMPK4* regula negativamente la expresión de los genes relacionados con la respuesta de defensa y positivamente la expresión de los genes relacionados con el crecimiento y desarrollo de la planta (Liu *et al.*, 2011). Muchos mutantes de *A. thaliana* que presentan altos niveles de producción de SA tienen este mismo fenotipo de activación constitutiva de genes de defensa y aborto del crecimiento (Dietrich *et al.*, 1997; Pitzschke *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2007; Yang *et*

al., 2007; Yang y Hua, 2004). Así, la inactivación del gen *GmMPK4* que se produjo en ausencia del T3SS podría también ser responsable del aborto del crecimiento de la raíz principal de las plantas de soja Williams.

El gen *GmPR2* es inducible por ET y también por SA (Mazarei *et al.*, 2007), por lo que el leve incremento de ET y/o el aumento significativo de SA en las raíces de soja inoculadas con el mutante HH103 *ttsI::Ω* podrían ser la causa principal de la expresión de este gen observado a los 2 d.p.i. (Figura 32). Además, la activación a través del incremento de SA endógeno, inducido por la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω*, se encuentra apoyada por la activación del gen *GmPR2* en las raíces de las plantas de soja tratadas con SA exógeno (Figuras 32 y 33).

El papel del JA en la nodulación no está claro, ya que se han descrito efectos contrapuestos dependiendo de la especie de leguminosa, del tipo de jasmonato utilizado, y de cuándo, dónde y cómo se aplica la hormona (Ferguson y Mathesius, 2014). Algunos estudios sugieren que esta hormona podría actuar como un regulador negativo de la nodulación. Así, el JA añadido de forma exógena sobre el medio de cultivo de las plantas inhibe la expresión de los genes de nodulación temprana (Sun *et al.*, 2006). Además, otros derivados del JA, como el metiljasmonato (MeJA, del inglés Methyl Jasmonate) también ejercen un efecto negativo sobre la nodulación. En este caso la adición exógena sobre la parte aérea afecta negativamente al desarrollo de los tubos de infección y a la expresión de los genes de nodulación (Nakagawa y Kawaguchi, 2006). Sin embargo, algunos autores sugieren que la nodulación y el desarrollo del tubo de infección pueden verse promovidos tras el tratamiento con JA y bajo unas condiciones de crecimiento de luz específicas (Suzuki *et al.*, 2011). Incluso otros autores demostraron que los jasmonatos activan la expresión de los genes *nod* de *R. leguminosarum* y *B. japonicum* e incrementa la producción de factores Nod en *B. japonicum* (Mabood y Smith, 2005; Mabood *et al.*, 2006; Rosas *et al.*, 1998). Otros estudios sugieren que el JA está involucrado en la AON en soja. Así, la inoculación de las raíces de soja con el rizobio desencadena una regulación negativa de los genes relacionados con la biosíntesis del JA en las hojas (no en las raíces) a través de la proteína receptora quinasa GmNARK, relacionada con la AON (Seo *et al.*, 2007).

La cuantificación del JA-ile endógeno mediante HPLC en las raíces de soja Williams mostró que durante los primeros 4 d.p.i. no existían grandes diferencias en la

concentración de JA-ile entre los tratamientos ensayados, salvo un ligero incremento de estos niveles a los 4 d.p.i. en las plantas inoculadas con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω*. Sin embargo, a los 8 d.p.i. se obtuvo un pico muy claro de producción de esta hormona únicamente en las raíces de las plantas inoculadas con la estirpe silvestre HH103 (**Figura 28**). Ya que los estudios realizados en base a sus efectos sobre la nodulación son muy controvertidos, el incremento del nivel de esta hormona inducido por la estirpe silvestre HH103 no puede explicarse en estos términos. Sin embargo, se conoce que la señalización por JA antagoniza a la señalización por SA y que muchos patógenos biotróficos explotan esta propiedad para atenuar las respuestas de defensa del hospedador (**Glazebrook, 2005**). En las plantas que fueron inoculadas con la estirpe silvestre HH103, el incremento de JA-ile observado a los 8 d.p.i. se correlaciona con la baja concentración de SA. Además, aquellas plantas inoculadas con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* presentaron concentraciones muy bajas de JA-ile en todos los puntos ensayados, correlacionándose con los altos niveles de SA detectados (**Figuras 27 y 28**). Además, **Liu et al. (2011)** indicaron que la quinasa MPK4 podría regular positivamente la vía de señalización del JA en soja, lo que podría ser una razón de los altos niveles de producción de JA-ile en las raíces de soja Williams inoculadas con la estirpe silvestre HH103 a los 8 d.p.i. (**Figuras 28 y 37**).

El ABA regula el estado hídrico, así como un gran número de procesos involucrados en el desarrollo de las plantas. En los últimos años se ha comenzado a darle mayor peso al papel del ABA en las respuestas de defensa activadas por estrés biótico (**Asselbergh et al., 2008; Mauch-Mani y Mauch, 2005**). Los estudios realizados sobre esta hormona en relación a la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa han demostrado que el ABA reduce el número de tubos de infección y la inducción de la producción de calcio via factores Nod y de los genes que codifican para las nodulinas tempranas *ENOD11* y *RIP1* (**Ding y Oldroyd, 2009**). Sin embargo, también se le han atribuido efectos positivos sobre la nodulación. Así, **Palma et al. (2014)** demostraron que el ABA promovía la fijación biológica de nitrógeno en condiciones de estrés salino, mediante la inducción de enzimas antioxidantes. En general, los valores de concentración de ABA en las raíces de soja Williams se detectaron a las 2 h.p.i. y a los 2 d.p.i., descendiendo con el tiempo. Las escasas diferencias observadas se centraron en las raíces inoculadas con la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω* a las 2 h.p.i. y a los 2 d.p.i., en los que los valores fueron ligeramente mayores a los obtenidos en las raíces inoculadas con la estirpe parental

HH103 (**Figura 29**). El papel del ABA en el desarrollo de la planta podría explicar los altos niveles encontrados de esta hormona en las etapas de nodulación muy temprana, ya que las plantas control sin inocular presentaron, al igual que el resto de las plantas tratadas, niveles muy elevados de ABA. Los resultados obtenidos indican que el T3SS de HH103 parece suprimir la leve inducción de esta hormona activada por el rizobio, aunque estas diferencias no son tan claras como las observadas en el balance hormonal del SA durante la infección. De hecho, los mayores valores de ABA inducidos por la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω*, a las 2 h.p.i. y a los 2 d.p.i., podrían ser un efecto secundario provocado por el balance hormonal de SA que la planta sufre a través del reconocimiento del rizobio (**Figuras 27 y 29**).

Los resultados obtenidos en esta Tesis, junto a los descritos por diversos autores, ponen de manifiesto la implicación que el SA actúa de forma negativa sobre el desarrollo de la planta y el proceso infeccioso durante la patogénesis o la nodulación. Existen numerosos estudios que han demostrado que los patógenos pueden imitar o actuar sobre la biosíntesis o las rutas de señalización de las hormonas para superar la inmunidad innata y modular el metabolismo del hospedador para su propio beneficio (**Robert-Seilaniantz et al., 2011**). De modo que, tanto los patógenos como los simbioses, se sirven de ciertos mecanismos para reducir los niveles de SA producidos como mecanismos de defensa para así poder colonizar e infectar y, en el caso de los simbioses, establecer una relación simbiótica efectiva. Los estudios realizados en esta Tesis revelan que el T3SS es responsable de la mitigación de la respuesta de defensa mediada por SA, ya que su ausencia provocó un aumento en la producción de esta hormona. Este efecto se correlacionó con la inhibición de los genes *PR* (al menos, *GmPR1* y *GmPR2*), la activación del gen *GmMPK4* y la consecuente inactivación del gen *GmWRKY33*, el mayor desarrollo de las raíces de la planta y, posiblemente, con la producción de JA (**Figura 82**).

El efecto que posee el T3SS sobre la supresión de la respuesta de defensa mediada por SA podría ser debido a la acción de uno de los efectores secretados a través de este sistema o por un conjunto de ellos. El efector específico de los rizobios NopL parece estar involucrado en la regulación de las respuestas de defensa de la planta a través de la interferencia con la señalización de las MAPK del hospedador (**Bartsev et al., 2004; Zhang et al., 2011**). Además, la expresión transitoria de la proteína NopL en hojas de tabaco reduce los efectos de la quinasa SIPK, cuya expresión se induce por altos niveles

de SA en presencia de un patógeno (Zhang y Klessig, 1998; Zhang *et al.*, 2011). Todos estos resultados indican que NopL de HH103 podría modular la señalización de las MAPK a nivel transcripcional.

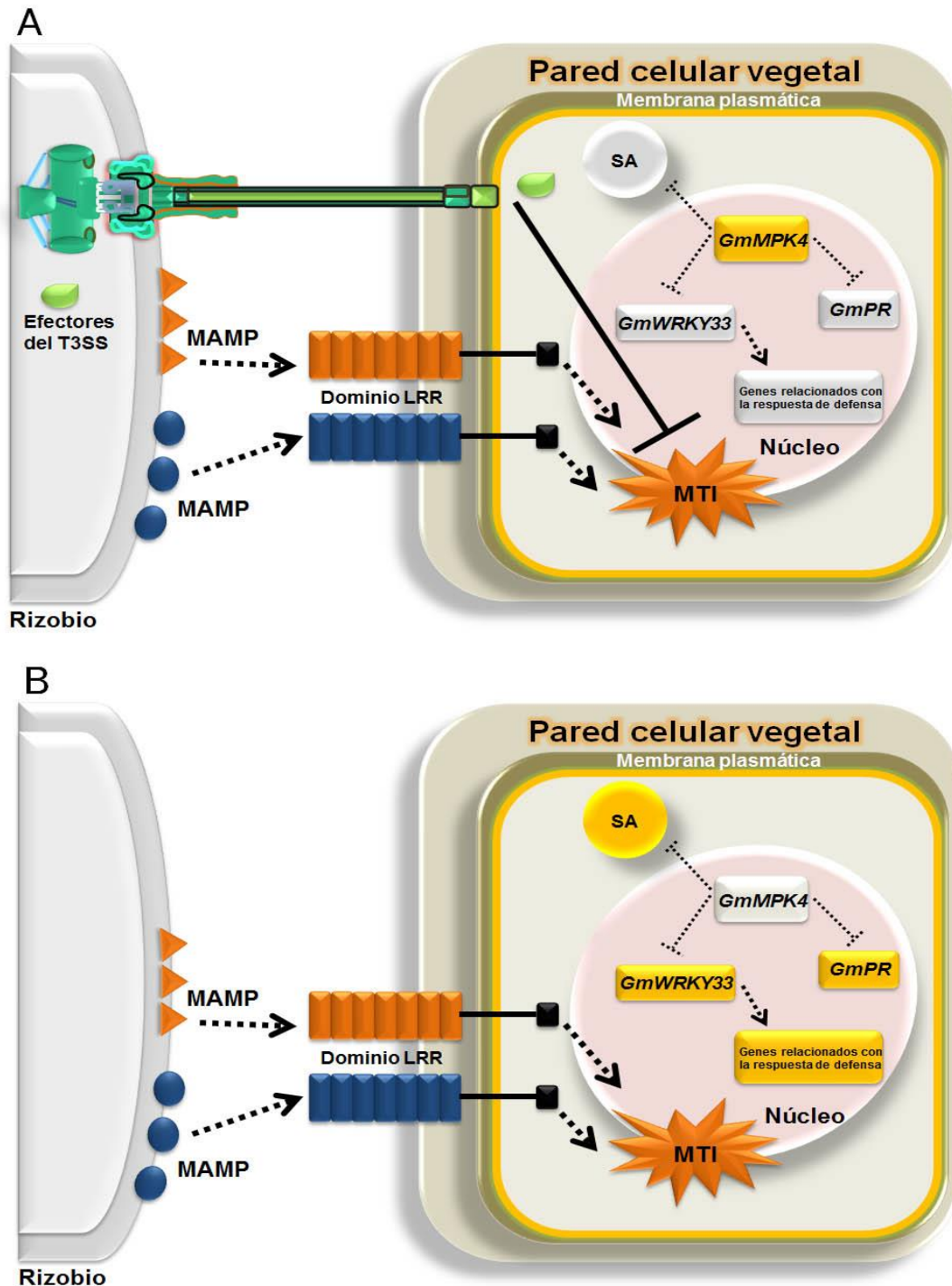


Figura 82. Procesos moleculares inducidos por *S. fredii* HH103 en la célula de la raíz de soja Williams. Los círculos o recuadros amarillos indican que existe una mayor producción o activación, respectivamente. Los círculos o recuadros grises indican que se existe una baja producción o activación, respectivamente. **A**, efectos inducidos por la estirpe silvestre HH103. **B**, efectos inducidos por la estirpe mutante HH103 *ttsI::Ω*.

Hasta la fecha, las respuestas de defensa activadas durante las interacciones simbióticas *Rhizobium*-leguminosa han sido descritas como débiles y transitorias. Sin embargo, en esta Tesis se demuestra que el reconocimiento de alguna MAMP de la estirpe HH103, aún sin identificar, activa fuertes respuestas de defensa relacionadas con la MTI en la planta de soja, de forma que la eficiencia de la nodulación se ve reducida. Dentro de estas respuestas se encuentra la producción de algunas hormonas en la que el SA juega un papel principal. Diversos trabajos descritos sobre las relaciones patogénicas relacionan las altas concentraciones de SA con la activación de los genes *PR*, la producción de ROS, la HR, así como con el establecimiento de la SAR. En el caso de la simbiosis entre *S. fredii* HH103 y la soja, se ha comprobado que existe una relación positiva entre la producción de SA y la activación del gen *GmPRI*. Incluso se ha observado que existe un efecto sistémico, deducido a través de la producción de SA y la expresión del gen *GmPRI* en las hojas de la planta, además de una cierta protección ante una segunda infección causada por el patógeno *P. syringae* en la parte aérea. Esto puede ser debido a que el incremento en la producción de SA por la inoculación con el rizobio se correlaciona con una disminución de la expresión del gen *GmMPK4*. El producto de este gen, la quinasa MPK4 de soja, es un regulador negativo de la producción de SA, ROS y de la activación de los genes *PR* y, a su vez, es un regulador positivo del crecimiento y desarrollo de la planta. Además, esta proteína regula negativamente la expresión del factor de transcripción WRKY33, implicado en la activación de otros genes relacionados con la respuesta defensiva. Así, la inactivación de la expresión del gen *GmMPK4* por el incremento en SA tras la inoculación puede provocar la activación de los genes de defensa de la planta (como el gen *GmPRI*), directamente o indirectamente a través del factor de transcripción WRKY33, y la represión de los genes relacionados con el desarrollo y el crecimiento de la planta de soja.

La simbiosis se describe como un proceso en el que ambos miembros de la relación obtienen beneficios. Sorprendentemente, las respuestas de defensa activadas en la soja a través del reconocimiento del rizobio son muy similares a las activadas por los patógenos (**Figura 83**). Numerosos autores han apoyado la hipótesis que explica que los rizobios derivan de un microorganismo patógeno y que, evolutivamente, han adquirido diversas estrategias para modular las respuestas de defensa activadas en la planta para establecer la simbiosis. Además, el principal beneficio que esta relación le reporta a la planta

(fijación de nitrógeno) es, quizás, mayor que el que obtiene el rizobio (vivir en un ambiente seguro), por lo que la planta podría incluso servirse de ciertas respuestas de defensa para dirigir la organogénesis del nódulo y el establecimiento de la simbiosis. En primer lugar, el reconocimiento de un patógeno o un rizobio genera una de las respuestas de defensa más conocidas, como es el aumento de los niveles de calcio intracelulares en la célula vegetal, en el que la quinasa CCaMK juega un papel importante (Evangelisti *et al.*, 2014). Sin embargo, mientras que en las relaciones patogénicas esta señal activa una cascada de señalización que culmina en la activación de las respuestas de defensa, en la relación *Rhizobium*-leguminosa este efecto desencadena la organogénesis del nódulo por parte de la planta. Además, aunque los estudios sobre la AON son escasos, algunos autores han indicado que la AON se encuentra muy relacionada con la SAR, por lo que es posible que algunas de las moléculas o mecanismos sean similares. Incluso algunos estudios han indicado que los rizobios generan una respuesta similar a la HR, presumiblemente provocada por la producción inmediata de ROS tras el reconocimiento del rizobio por parte de la planta. De esta forma, la planta podría controlar la infección por un rizobio compatible y regular la nodulación (Figura 83) (Parniske *et al.*, 1990; Santos *et al.*, 2001; Vasse *et al.*, 1993). En las relaciones patogénicas, las ROS son producidas como un potente mecanismo de defensa. Sin embargo, en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, este proceso también se encuentra involucrado en el desarrollo y avance del tubo de infección (Figura 83). Por otro lado, los estudios sobre las diferentes hormonas involucradas en la defensa han indicado efectos muy dispares sobre la nodulación, ya que depende en gran medida de la metodología utilizada y del modelo *Rhizobium*-leguminosa. En general, todos los resultados obtenidos sobre los efectos positivos o negativos del ET, el ABA o el JA en la nodulación se pueden clasificar dependiendo del estadio del proceso simbiótico (Ferguson y Mathesius, 2014). Sin embargo, el SA ejerce un claro efecto negativo sobre la nodulación y es bien conocido que actúa de forma positiva en la respuesta de defensa de la planta hospedadora, por lo que los rizobios han adquirido diversos mecanismos para controlar la producción de esta hormona, como son los factores Nod o el T3SS.

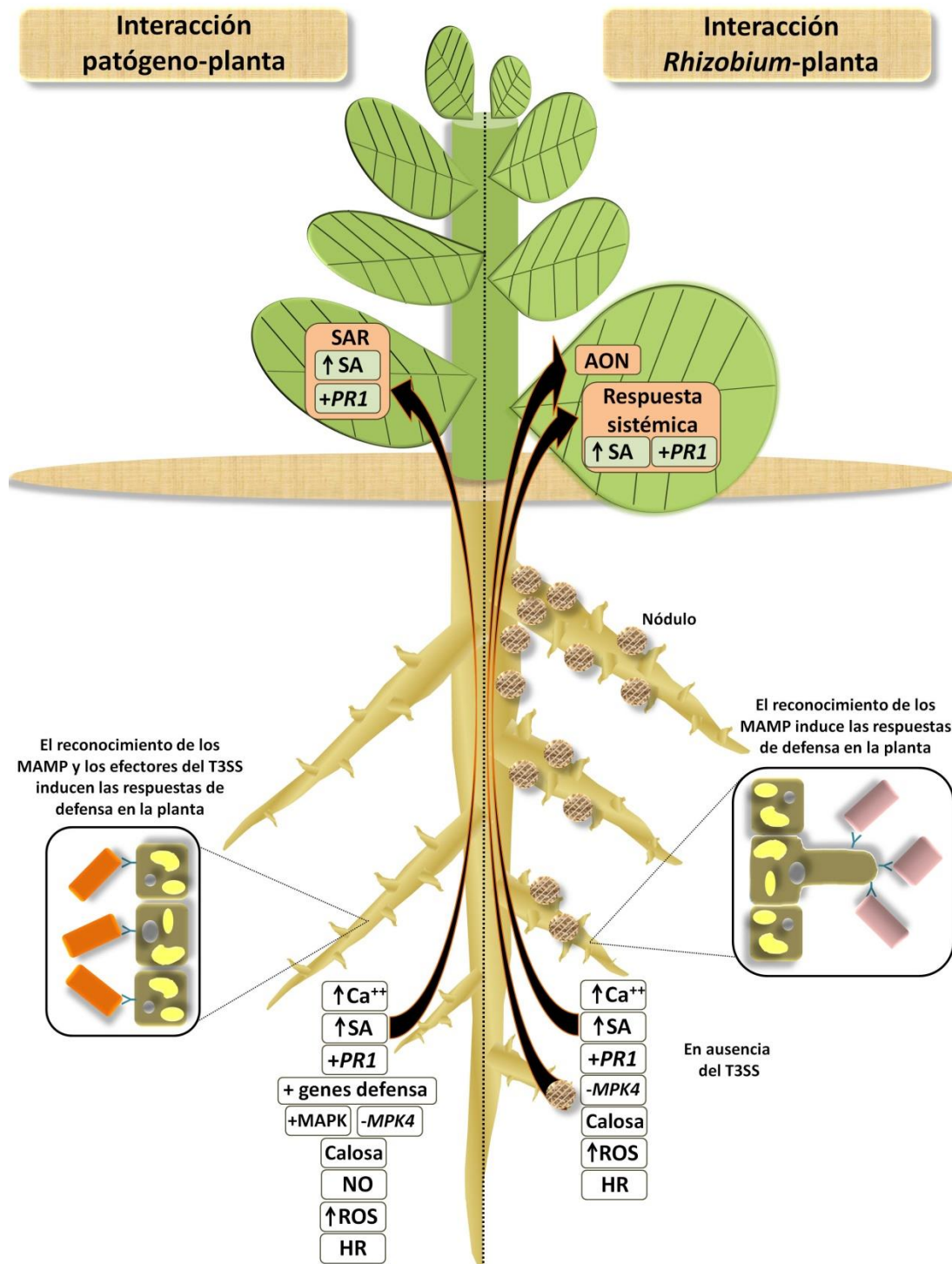


Figura 83. Algunas respuestas de defensa activadas en la planta debido al reconocimiento de los PAMP o MAMP del microorganismo infeccioso durante los procesos de patogénesis (MTI y ETI) y de simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (MTI).

Muchos microorganismos patógenos necesitan el T3SS para causar la enfermedad. En cambio, los rizobios no requieren el T3SS para la infección y la nodulación, de hecho, no todas las especies o estirpes de rizobios poseen un T3SS. Sin embargo,

muchos de los rizobios que han adquirido este sistema presentan un amplio rango de hospedador, como las estirpes NGR234, USDA257 y HH103 de *S. fredii* (de Lyra *et al.*, 2006; Meinhard *et al.*, 1993; Viprey *et al.*, 1998). Por lo tanto, la principal razón evolutiva sobre la adquisición del T3SS podría ser la de suprimir la respuesta de defensa temprana de la planta que podría producirse por el reconocimiento de un rizobio (como el aumento de la producción de SA) y así poder ampliar el rango de hospedador para inducir la formación de nódulos en un gran número de leguminosas diferentes. Curiosamente, el efecto sobre el fenotipo simbiótico de los mutantes afectados en el T3SS depende de la estirpe de rizobio estudiada y de la planta hospedadora. Este hecho podría ser una consecuencia de la combinación de distintos procesos, tales como el reconocimiento de los efectores como Avr y/o la acción de otros efectores sobre la supresión de las respuestas ETI y/o la implicación de ciertos efectores de forma positiva sobre el proceso de nodulación. Así, pueden encontrarse tres fenotipos simbióticos diferentes: neutro, en el que no existen diferencias con respecto a la estirpe silvestre, positivo, en el que la mutación genera alguna mejora significativa en cuanto a uno o más características simbióticas, o negativo, en el que la mutación genera un efecto negativo sobre la simbiosis. La mutación en el gen *rhcJ* o *ttsI* de HH103 provoca un empeoramiento de su capacidad simbiótica con los cultivares de soja americanos y asiáticos. Además, la ausencia de proteínas Nop provoca una mejora en su comportamiento simbiótico con la leguminosa tropical *E. variegata* (de Lyra *et al.*, 2006; Krishnan y Pueppke, 1994; López-Baena *et al.*, 2008).

Muchos de los efectores secretados a través del T3SS de los rizobios son funcionalmente homólogos a ciertos efectores de patógenos, como son NopD, NopM, NopJ y NopT. Además, algunas de estas proteínas son homólogas a efectores que son de tipo Avr, es decir, aquellos que son reconocidos por el sistema inmune del hospedador, interacción que desencadena la activación de las respuestas de defensa relacionadas con la ETI. Es por ello por lo que la presencia de este tipo de efectores puede producir fenotipos negativos sobre la nodulación, como podría ser el caso de NopT y de NopJ (Deakin y Broughton, 2009; Kambara *et al.*, 2009). La proteína NopT es homóloga a los efectores AvrPphB y YopT de *P. syringae* y *Yersinia* spp., respectivamente (Jenner *et al.*, 1991). La presencia de NopT provoca un efecto extremadamente negativo sobre la nodulación de NGR234 en *Crotalaria juncea* y en la simbiosis de HH103 en la soja Williams (datos no mostrados). Además, la presencia de

NopJ, homóloga al efector YopJ de *Y. pestis*, ejerce un efecto negativo en la simbiosis de NGR234 con todas las plantas hospedadoras ensayadas hasta el momento. Existen otros casos en los que la presencia de ciertos efectores del T3SS puede llegar incluso a bloquear completamente la nodulación, como ocurre en la simbiosis entre USDA257 y las variedades de soja americanas (Meinhardt *et al.*, 1993).

Por todo ello, en esta Tesis se estudió el efecto que genera la mutación del gen *ttsI* y de varios de los efectores de HH103 en la nodulación con diferentes plantas. Se ha demostrado que esta mutación hace que esta estirpe nodule en *L. japonicus* (Tabla 18 y Figura 65). Por lo tanto, deben existir uno o más efectores secretados a través del T3SS que son reconocidos por las proteínas R del sistema inmune de esta planta, lo que activaría una reacción de defensa tan fuerte como para bloquear por completo la nodulación, al igual que sucede en la simbiosis entre USDA257 y las variedades de soja americanas. Los ensayos de nodulación realizados mostraron que el gen *nopC* es el principal responsable del impedimento de la nodulación de la estirpe HH103 en *Lotus japonicus*, ya que la mutación en este gen proporcionó una eficiencia de nodulación muy similar a la que se obtuvo con el mutante HH103 *ttsI::Ω* (Tabla 18 y Figura 65). Por otro lado, la mutación puntual en el resto de los genes analizados (excepto *nopI*) indujo la capacidad de nodular *L. japonicus* por la estirpe HH103, aunque la eficiencia que se alcanzó no fue tan alta como la que se observó con los mutantes HH103 *ttsI::Ω* y HH103 *nopCΔ* (Tabla 18). NopC es una proteína específica de los rizobios y, hasta la fecha, se ha considerado como parte estructural del T3SS debido a su localización en el genoma y a su pequeño tamaño, muy similar a NopA, componente del apéndice extracelular o *pilus* del T3SS de los rizobios. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta Tesis, en los que se demuestra que NopC es translocado al interior de la célula hospedadora, apoyan la idea de que esta proteína es un efector, es decir, que la función de esta proteína se desarrolla en el interior de la célula hospedadora (Figura 63). En contraposición al fenotipo observado con el mutante *nopC*, el mutante afectado en el gen *nopI* no fue capaz de formar nódulos, no observándose ni siquiera la formación de pseudonódulos, como ocurrió con la inoculación de las raíces de *L. japonicus* con la estirpe silvestre HH103. Además, mientras que los simples mutantes afectados en los genes *nopP* y *nopL* fueron capaces de nodular esta leguminosa, los dobles mutantes en los que uno de los genes afectados fue *nopI* tampoco formaron nódulos o pseudonódulos (Tablas 18 y Figura 65). Todos estos resultados indican que la proteína

NopI parece estar involucrada de forma positiva en la formación de los nódulos en la simbiosis entre HH103 y *L. japonicus*, efecto que podría estar enmascarado por el reconocimiento de los efectores del T3SS, principalmente NopC, a través del sistema inmune de la planta, lo que desencadena un bloqueo total de la nodulación.

Por otro lado, los estudios realizados en esta Tesis sobre el fenotipo simbiótico de los mutantes afectados en los genes que codifican los efectores NopL, NopP y NopI con diferentes plantas hospedadoras arrojan datos muy diversos (**Tabla 27**). La presencia de la proteína NopL afecta de forma negativa a la simbiosis de HH103 con leguminosas que forman nódulos determinados y de forma positiva a la simbiosis entre HH103 y *S. tomentosa*, planta que presenta nódulos indeterminados. En este último caso, la presencia de este efector ejerce un fuerte efecto positivo. Por un lado, la mutación simple determinó la incapacidad total de formar nódulos en esta leguminosa. Sin embargo, los dobles mutantes en los que uno de los genes afectados fue *nopL* no alteraron de ninguna forma esta simbiosis, mientras que el doble mutante afectado en los genes *nopI* y *nopP* mejoró en gran medida la capacidad simbiótica de la estirpe HH103 en *S. tomentosa* (**Tabla 15**).

Por otro lado, se comprobó que la proteína NopI actúa de forma positiva en todas las relaciones simbióticas entre HH103 y las leguminosas ensayadas. Sin embargo, la presencia de la proteína NopP afecta de forma negativa en la simbiosis de esta estirpe con soja Williams y *L. japonicus*, mientras que actúa de forma positiva en la simbiosis con *S. tomentosa* y *V. unguiculata*. Curiosamente, los dobles mutantes, además del triple mutante, afectados en los genes *nopL*, *nopP* o *nopI*, presentaron un fenotipo fuertemente negativo en la simbiosis con soja Williams y *V. unguiculata*. Además, el triple mutante provocó efectos negativos en la simbiosis con *S. tomentosa* (**Tabla 27**).

La variedad fenotípica observada a través de los simples, dobles y el triple mutante, afectados en los genes que codifican para las Nop específicas de los rizobios, ponen de manifiesto que los efectores no actúan de forma individual, sino que sus funciones se encuentran entrelazadas o relacionadas de alguna forma. Este hecho explicaría, por ejemplo, que las mutaciones individuales en los genes *nopL* y *nopP* generen un efecto positivo en la simbiosis de HH103 y que el doble mutante afectado en esos genes presente un fenotipo simbiótico contrario.

Tabla 27. Efecto de la mutación del T3SS y de distintos genes *nop* sobre el comportamiento simbiótico de *S. fredii* HH103 en las leguminosas hospedadoras ensayadas en esta Tesis.

Mutación	Ningún efecto	Efecto positivo	Efecto negativo
T3SS no funcional		<i>Lotus japonicus</i> (D)	
		<i>Erythrina variegata</i> (D)	<i>Glycine. max</i> cv. Williams (D)
		<i>G. max</i> cv. Williams (D)	
<i>nopL</i>		<i>V. unguiculata</i> (D)	<i>Sophora tomentosa</i> (I)
		<i>Lotus japonicus</i> (D)	
<i>nopI</i>			<i>G. max</i> cv. Williams (D)
			<i>Sophora tomentosa</i> (I)
			<i>Vigna unguiculata</i> (D)
			<i>Lotus japonicus</i> (D)
<i>nopP</i>		<i>G. max</i> cv. Williams (D)	<i>Sophora tomentosa</i> (I)
		<i>Lotus japonicus</i> (D)	<i>Vigna unguiculata</i> (D)
<i>nopP-nopL</i>	<i>Sophora tomentosa</i> (I)	<i>Lotus japonicus</i> (D)	<i>G. max</i> cv. Williams (D)
			<i>Vigna unguiculata</i> (D)
<i>nopI-nopP</i>		<i>Sophora tomentosa</i> (I)	<i>G. max</i> cv. Williams (D)
			<i>Vigna unguiculata</i> (D)
<i>nopI-nopL</i>	<i>Sophora tomentosa</i> (I)		<i>Lotus japonicus</i> (D)
			<i>G. max</i> cv. Williams (D)
			<i>Vigna unguiculata</i> (D)
<i>nopI-nopP-nopL</i>			<i>Lotus japonicus</i> (D)
			<i>G. max</i> cv. Williams (D)
			<i>Sophora tomentosa</i> (I)
<i>nopC</i>		<i>Lotus japonicus</i> (D)	
		<i>Lotus japonicus</i> (D)	
<i>nopD</i>		<i>Lotus japonicus</i> (D)	
		<i>Lotus japonicus</i> (D)	
<i>nopT</i>		<i>G. max</i> cv. Williams (D)	
		(datos no mostrados)	

El proceso evolutivo que se da en las relaciones entre los microorganismos infecciosos y las plantas hospedadoras ejerce una presión sobre la aparición de nuevos efectores destinados a suprimir las respuestas de defensas activadas durante la ETI por el reconocimiento de otros efectores traslocados por el mismo microorganismo. No es de extrañar que, en el caso de los rizobios, estos efectores sean los específicos de este grupo y que, además, esta función la puedan desempeñar varios efectores al mismo tiempo, como podría ser el caso de NopL y NopP e, incluso, NopI. Además, podrían estar directamente involucrados en el desarrollo del proceso de nodulación, lo que nos

plantea la necesidad de profundizar sobre las dianas de los efectores secretados a través de este sistema. De esta forma, no solo permitiría identificar los procesos vegetales y los mecanismos involucrados en la activación de las respuestas de defensa, sino también aquellos responsables de la organogénesis del nódulo.

Los efectores mejores estudiados entre los rizobios son NopL y NopP, aunque, la información de la que se dispone no es muy extensa. Sin embargo, hasta la fecha no existe ningún estudio sobre la proteína NopI. La expresión de los genes *nopI*, *nopL* y *nopP* de HH103 dependen de flavonoides y de los reguladores NodD1 y TtsI (**Figuras 45 y 53; López-Baena et al., 2009**). La secuencia aminoacídica de NopL de USDA257 es idéntica a la de HH103 y ambas proteínas presentan una gran similitud con la homóloga de NGR234, por lo que posiblemente ejerzan funciones similares en las distintas estirpes (**Figura 41**). La secuencia de aminoácidos del efector NopP de HH103 es muy similar a la de las correspondientes proteínas homólogas de USDA257 y NGR234, pero distinta a la de *B. japonicum* USDA110 (**López-Baena et al., 2009**). La translocación de NopL y NopP se ha comprobado a través de la cuantificación de la actividad adenilato ciclasa, por lo que pueden considerarse efectores reales (**Figuras 47 y 63; Schechter et al., 2010**). Por otro lado, NopI solo se ha encontrado, además de en HH103, en la estirpe USDA257 y en *Ensifer* sp. TW10, compartiendo con éstas un 99% de identidad en cuanto a su secuencia aminoacídica. Además, NopI posee cierta similitud con la proteína NopP. Por ello, aunque no se haya comprobado su translocación al interior de la célula eucariota, su similitud con NopP podría indicar que, al igual que NopP y NopL, NopI podría ser un efector.

Los primeros estudios sobre la caracterización de estos efectores se centraron en determinar si NopL y NopP (de NGR234) funcionan como sustrato de quinasas de la célula eucariota. NopI, al igual que NopL y NopP, posee aminoácidos susceptibles de ser fosforilados (**Figura 49**) y entre ellos se encuentra una tirosina situada en una secuencia similar al dominio EPIYA (EPPIYE en HH103) de ciertos efectores de bacterias patógenas como *Helicobacter pilorii*. Los efectores denominados EPIYA y aquellos que poseen un dominio similar son fosforilados en el aminoácido tirosina de este mismo dominio e interaccionan con diferentes proteínas que presentan un dominio SH2 y que intervienen en la señalización intracelular del organismo hospedador. De esta forma, las bacterias patógenas que poseen este efector manipulan las funciones de la célula para aumentar la efectividad de la infección y mejorar la colonización sobre el hospedador

(Backert *et al.*, 2010; Hayashi *et al.*, 2013; Selbach *et al.*, 2009). Por lo tanto, si el dominio EPPIYE de NopI ejerce una función similar al dominio homólogo de los efectores de patógenos, ésta sería la primera vez que se describe que este tipo de dominios también se encuentra en efectores de simbiosis.

Estudios anteriores indicaron, mediante ensayos de fosforilación *in vitro*, que NopL es fosforilada por quinasas de *N. tabacum* y de *L. japonicus* y que, además, mediante el uso de extractos proteicos de tabaco se detalló que esta quinasa podría ser de tipo serina/treonina quinasa, además de ser una MAPKK u otra quinasa derivada de este tipo de rutas (Bartsev *et al.*, 2003). Estudios posteriores enriquecieron esta idea, ya que se demostró que NopL de NGR234 posee en su secuencia proteica 4 residuos de serinas fosforilables, cuyo patrón Serina/Prolina es típico de sustratos de MAPK (Zhang *et al.*, 2011). Además, los estudios realizados mediante la sobreexpresión del gen *nopL* de NGR234 en plantas de tabaco demostraron que NopL bloquea la expresión de las proteínas de defensa o proteínas PR de la planta tras la infección con un agente patógeno. Sin embargo, no se observó ningún efecto, salvo un menor desarrollo de la planta, cuando se transformaron plantas de *L. japonicus* (Bartsev *et al.*, 2004). Por todo ello, los autores sugieren que la función del efector NopL podría ser la de modular las rutas de señalización de defensa de la planta a través de las rutas de las MAPK que culminan en la activación de los genes PR (Bartsev *et al.*, 2004). Más recientemente, se ha descrito que la expresión transitoria de la proteína NopL en hojas de tabaco reduce los efectos de la quinasa SIPK, cuya expresión se induce por altos niveles de SA en presencia de un patógeno (Zhang y Klessig, 1998; Zhang *et al.*, 2011), lo que conduce a pensar que este efector podría ser uno de los responsables de la supresión de la respuesta de defensa temprana observada en la soja tras el reconocimiento de HH103, como se comentó anteriormente. Por otro lado, al igual que ocurre con la proteína NopL, NopP también es sustrato de proteínas con actividad quinasa de la planta. Skorpil *et al.* (2005) demostraron que en la cascada de señalización que culmina en la fosforilación de NopP de NGR234 intervienen quinasas de tipo tirosina y serina/treonina quinasas de los microsomas de la leguminosa *Flemingia congesta*. Sin embargo, mediante los ensayos de fosforilación no se observó inhibición mediante la utilización del inhibidor de las proteínas MAPKK, como sucedía con el efector NopL.

Los resultados obtenidos en esta Tesis demuestran que la proteína NopL de HH103 es fosforilada por una quinasa eucariota de tipo serina/treonina quinasa, mientras que

NopP es fosforilada por una de tipo serina/treonina quinasa y tirosina quinasa. Incluso, a partir de estos resultados se puede deducir que la quinasa que fosforila a NopL, pero no a NopP, podría ser de tipo MAPKK u otra relacionada con las rutas de las MAPK (**Figuras 69 y 77**). Todo ello indica que las quinasas que fosforilan a NopL y NopP de NGR234 son las mismas o de la misma naturaleza que las que fosforilan a NopL y NopP de HH103. Sin embargo, mediante la utilización de la soja como organismo modelo, se comprobó que ambas quinasas dependen de calcio, resultados que no se obtuvieron anteriormente por otros autores (**Figuras 69 y 77**). El calcio es primordial en los estadios tempranos del proceso de nodulación, así como en las respuestas de defensa activadas en el hospedador tras el reconocimiento de un microorganismo infeccioso. Todo ello conlleva a pensar que la función de NopL y NopP dependen de los cambios fenotípicos desarrollados en los primeros estadios de la nodulación, cuando también son activadas las respuestas de defensa y que, en conjunto, determinan el rumbo de la interacción simbiótica.

Además de las MAPK, en las plantas existen otras quinasas que se encuentran involucradas en las rutas de traducción de las señales: las quinasas dependientes de calcio o CDPKs (del inglés, Calcium-Dependent Protein Kinases). Las CDPK son quinasas de tipo serina/treonina dependientes de calcio que pueden localizarse tanto en el citoplasma como en otros compartimentos celulares, tales como el RE o el núcleo (**Boudsocq y Sheen, 2013**). Algunos estudios han indicado que la regulación de la transcripción de los genes que codifican estas proteínas se encuentra contralada por las MAPK y que, además, algunas CDPK parecen estar involucradas en la respuesta de defensa que se da durante la ETI, como NtCDPK2 de *N. benthamiana* (**Heinrich et al., 2012**). Por lo tanto, NopL podría fosforilarse en el interior de la célula eucariota vegetal por una CDPK, interacción que podría depender de las MAPK, así como otra quinasa independiente de ésta.

Para determinar qué quinasa fosforila NopL y NopP se realizaron ensayos de fosforilación “en gel”. A partir de este tipo de experimento no se obtuvo ningún resultado para NopP (**Tabla 22**), sin embargo, para NopL se identificaron dos proteínas que comparten cierta similitud con quinasas de tipo serina/treonina, un receptor quinasa HSL1 (de tipo LRR) y la isoforma X1 de una serina/treonina quinasa de tipo ATR, relacionada con el ciclo celular (**Tabla 19**) (**Cortez et al., 2003; Culligan et al., 2004**). Por otro lado, mediante ensayos de inmunoprecipitación se determinó que NopL podría

interaccionar con MPK15 de tabaco, quinasa que en *Arabidopsis* se encuentra incluida en el grupo D y en arroz en el E, grupos de MAPK cuyas funciones están aún por dilucidar (Ichimura *et al.*, 2002; Reyna y Yang, 2006).

En cualquier caso, aunque estos efectores sean fosforilados o potencialmente fosforilables por quinasas de la célula de la raíz de soja, existe un profundo desconocimiento sobre la localización de ambos efectores en el interior de la célula eucariota así, como su interacción con proteínas dianas del hospedador. Para el estudio de la localización de los efectores NopL y NopP se fusionaron a la proteína fluorescente YFP, se expresaron en las células epidérmicas de las hojas de *N. benthamiana* y su localización se analizó mediante microscopía confocal. Finalmente, se comprobó que el efector NopI se localiza en el citoplasma eucariota y que los efectores NopL y NopP, una vez que son traslocados al interior de la célula eucariota, se dirigen principalmente hacia el compartimento nuclear, donde deben ejercer su función como nucleomodulinas (efectores que actúan en el núcleo) (Bierne y Cossart, 2012) (Figuras 72, 73, 80, 81 y 84). Comúnmente, los efectores acceden al núcleo debido a que poseen en su secuencia un dominio denominado NLS, que puede variar dependiendo del efector. Sin embargo, el mecanismo de entrada al núcleo de otros muchos efectores es desconocido, como ocurre con NopL y NopP. En el caso de NopP, los resultados obtenidos a partir de la utilización del array de *S. cerevisiae* indicaron que su localización en el compartimento nuclear podría estar ligada al citoesqueleto de la célula hospedadora (Tabla 24). Por otro lado, cómo los efectores son dirigidos a sus dianas específicas, una vez que llegan al núcleo, sigue siendo aún un enigma.

La manipulación de las células hospedadoras a nivel nuclear se encuentra ampliamente extendido entre las bacterias, sin embargo, los conocimientos sobre las dianas y los procesos que se ven afectados por los efectores son muy escasos. El análisis genómico de multitud de especies bacterianas ha permitido la identificación de numerosos efectores relacionados estructuralmente e incluidos en diferentes familias relacionadas con las nucleomodulinas, como son los efectores TAL (del inglés, Transcription Activator-Like), IpaH, CDT (del inglés, Cyclolethal Distending Toxins), Cif (del inglés, Cycle Inhibiting Factors) y proteínas que contienen los dominios F-box, SET o Ank. Dependiendo de la familia, las nucleomodulinas pueden actuar como factores de transcripción, controlando o mimetizando factores regulatorios de la cromatina, como enzimas bacterianas que modifican a ciertos reguladores nucleares de

la expresión de genes eucariotas, o alterando el ciclo de la célula y la integridad del ADN. Los efectores TAL poseen ciertas características comunes, como son el requerimiento de la señal amino terminal para la secreción a través de la maquinaria del T3SS o el dominio de repeticiones en tándem de una secuencia peptídica de alrededor de 34 aminoácidos, necesarias para el reconocimiento de las zonas específicas del ADN a las que se unen estos efectores, las denominadas cajas TAL (**Boch y Bonas, 2010; Bogdanove et al., 2010; Boch et al., 2009**). En el caso de NopL de HH103 se da una única repetición de 34 residuos incluidos en una secuencia de 57 aminoácidos. Sin embargo, mediante la comparación de la secuencia aminoacídica de NopL frente al resto de secuencias de efectores bacterianos no se encontró la presencia del dominio TAL ni de ningún otro dominio proteico conocido hasta el momento.

Curiosamente, se observó que los efectores NopL y NopP de HH103 se encontraban dispuestos en focos o cuerpos nucleares, al igual que ocurre con el efector XopD del microorganismo fitopatógeno *Xanthomonas campestris*. Los autores relacionan la localización de XopD en estas estructuras con la actividad de desSUMOilación que posee el efector. Además, se ha comprobado que el dominio HLH (Hélice-Lazo-Hélice) de XopD es necesario y suficiente para inducir la formación de los focos nucleares (**Canonne et al., 2011**). Sin embargo, NopL y NopP carecen de cualquier dominio estudiado hasta el momento. Por otro lado, algunos autores sugieren que los focos nucleares se localizan de forma múltiple en las células en proliferación. Ésto ocurre en respuesta a un estrés replicativo y podría ser una señal para marcar aquellos sitios en los que la cromatina duplicada está incompleta u otros tipos de lesiones del ADN o la cromatina que pueden ser reparados (**Baranski et al., 2015; Harrigan et al., 2011; Lukas et al., 2011**). Durante el proceso de nodulación, las células del córtex de la raíz del hospedador se dividen rápidamente, lo que puede llegar a generar un estrés replicativo, generando lesiones en el ADN o la cromatina y activando los mecanismos que culminan en la senescencia o la apoptosis. La disposición de los efectores NopL y NopP en focos nucleares apoya la idea de que ambos efectores puedan actuar conjuntamente mitigando el estrés replicativo y evitando la senescencia del nódulo. En cualquier caso, aunque la finalidad de estas estructuras se desconoce, el aumento local de las proteínas suele facilitar la función propia de la proteína, como las actividades enzimáticas o los procesos de traducción de la señal (**Anderson et al., 2001**).

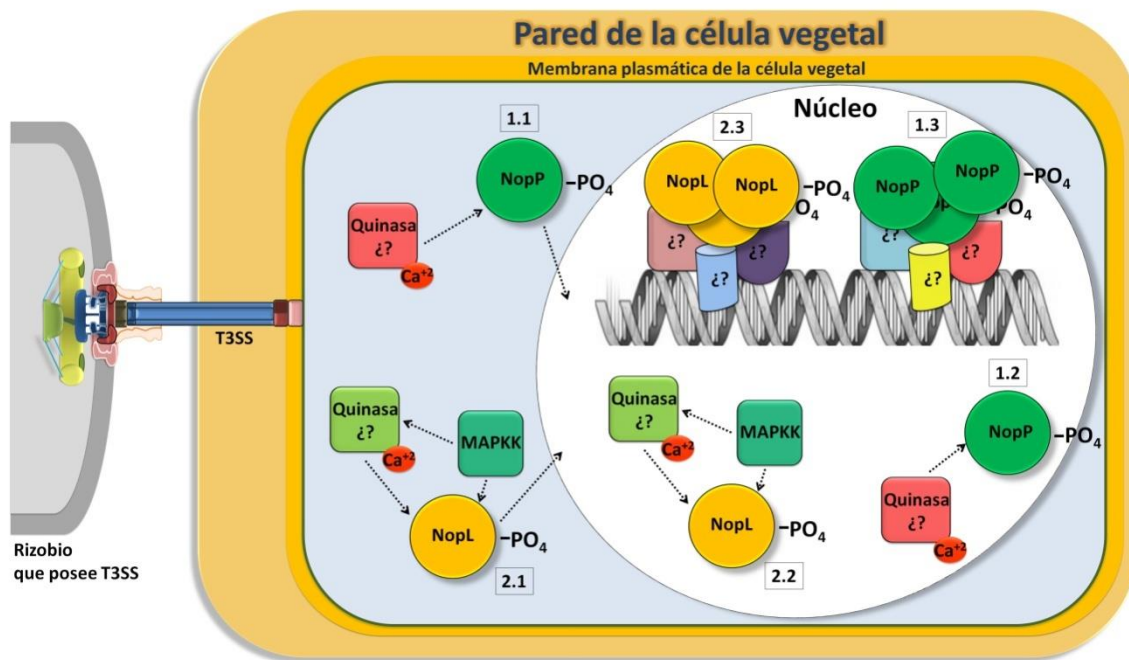


Figura 84. Localización y fosforilación de NopL y NopP en la célula eucariota. Fosforilación de NopP en el citoplasma (1.1) o en el núcleo (1.2) de la célula por una quinasa dependiente de calcio de tipo tirosina y serina/treonina quinasa. Localización de NopP en el núcleo de la célula dispuesto en focos nucleares (interacción con otras proteína y/o unido al ADN o libre) (1.3). Fosforilación de NopL en el citoplasma (2.1) o en el núcleo (2.2) por una quinasa dependiente de calcio de tipo serina/treonina quinasa por. Localización de NopL en el núcleo de la célula dispuesto en focos nucleares (interacción con otras proteína y/o unido al ADN o libre) (2.3).

A medida que avanzan los conocimientos sobre la localización y función de los diversos efectores del T3SS, se ha descrito que un gran número de ellos se dirigen al núcleo de la célula hospedadora, donde interaccionan con algún componente (o función) esencial en el establecimiento de la respuesta inmune de la planta (Deslandes y Rivas, 2011). Para la determinación de las proteínas que potencialmente pueden interaccionar con NopL y NopP en la célula eucariota, se realizó una secuenciación de las proteínas provenientes de extractos de hojas de *N. benthamiana* que co-inmunoprecipitaron con ambos efectores.

Entre las proteínas de tabaco que podrían interaccionar con NopL, además de MPK15, se encontraron algunas relacionadas con la pared celular vegetal (pectinesterasas y proteína de membrana de la banda de Caspary), con el metabolismo, con los ácidos nucleicos (Myb) y con el sistema inmune, I2 y NTGP4 (AIG1) (Tabla 21). Las proteínas codificadas por los genes de resistencia *R* o *I2*, son receptores

intracelulares que reconocen los efectores translocados por las bacterias, mientras que NTGP4 pertenece a una familia de proteínas involucradas en el crecimiento y desarrollo, así como en el sistema inmune de la planta (**Couch *et al.*, 2006; Wang y Li, 2009**). Por un lado NopL podría interactuar con estas proteínas con el fin de secuestrarlas para evitar que éstas realicen su función. Por el otro, NopL podría ser detectada por los mecanismos de defensa de la planta de tabaco, efecto debido al uso de esta planta como hospedador.

El ensayo también indicó la posible interacción entre NopL y una proteína denominada calreticulina. Existen numerosos estudios sobre la calreticulina que la describen como un tipo de proteína de unión a calcio, muy conservada entre los organismos eucariotas, y cuya función mejor descrita es la de actuar como chaperona en el RE. Sin embargo, las CRT se encuentran involucradas en diversos procesos, como la regulación intracelular de calcio, la señalización dependiente de calcio, la apoptosis o el sistema inmune (**Jia *et al.*, 2009**). Aunque la investigación sobre estas proteínas se ha centrado en aquellas que actúan en el RE de las células de mamíferos, los estudios que existen sobre la función de las CRTs en plantas señalan que las CRT también pueden localizarse fuera de este compartimento. Así, se ha demostrado su localización en la envuelta nuclear, en el núcleo, en el citoplasma de la célula, así como en la superficie de la célula (**Dedhar, 1994; Guo *et al.* 2003; Jia *et al.* 2008; Qiu *et al.*, 2012**). Además, se ha descrito que estas proteínas se relacionan con el crecimiento de la planta, el desarrollo, así como con las respuestas a diversos estreses. En las plantas existen dos isoformas de CRT y ambas son importantes reguladores del sistema inmune. Los estudios relacionados con la CRT de *A. thaliana* indican que el dominio carboxilo terminal de unión a calcio de la isoforma AtCRT2 juega un papel fundamental en la regulación de la concentración de SA endógeno y que el dominio amino terminal de la misma proteína se relaciona con la supresión de las respuestas de defensa relacionadas con el aumento de los niveles de SA (**Qiu *et al.*, 2012**). Por lo tanto, es posible que NopL se asocie a la CRT para así mantener bajos niveles de SA en la planta y/o actuar conjuntamente con ésta con el fin de suprimir de forma efectiva las respuestas de defensa relacionadas con el SA.

Algunos estudios han aislado diversas proteínas en la membrana de origen eucariota que recubre al bacteroide, como en el espacio peribacteroide, originado en el proceso de formación de los bacteroides durante la nodulación. La mayoría de esas proteínas son

de origen eucariota. Además, muchas de ellas, que se suelen localizar en un determinado orgánulo o en otros tejidos, parecen ser reclutadas para ejercer un nuevo papel en la simbiosis en las células infectadas de los nódulos o, incluso, pueden poseer un papel dual en éstas células. Curiosamente, entre estas proteínas se encontraron importantes chaperonas, como la CRT y la HSP70 de origen eucariota (**Clarke *et al.*, 2015; Emerich y Krishnan, 2014**). Por lo tanto, la posible interacción entre NopL y las proteínas HSP70 y CRT podría darse con el fin de controlar las respuestas de defensa activadas en el hospedador y, a su vez, estar íntimamente relacionada con el proceso de nodulación.

Otra de las aproximaciones llevada a cabo para conocer la función biológica de NopL en la célula eucariota fue la utilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, debido su gran simplicidad y a que en los últimos años se han desarrollado metodologías basadas en el uso de este microorganismo para estudiar la implicación de los efectores del T3SS en las rutas conservadas de la célula eucariota (**Curak *et al.*, 2009; Jamir *et al.*, 2004; Siggers y Lesser, 2008; Valdivia, 2004**). En esta Tesis se utilizó la técnica desarrollada por **Bossis *et al.* (2011)** (**apartado 3. 5. de Material y Métodos**). El análisis de los genes congruentes para NopL desveló que las proteínas codificadas por los genes *sst4* y *glc7* podrían ser dianas de NopL (**Tabla 20**). El gen *stt4* codifica una fosfatidilinositol (PI, del inglés, Phosphatidyl Inositol) 4 quinasa esencial, responsable de la producción de PI(4)P en la membrana plasmática (**Audhya y Emr 2002**). Los fosfoinosítidos son reguladores claves de una gran variedad de procesos celulares que incluyen la transducción de las señales, la proliferación celular, el tráfico vesicular, la apoptosis, la organización del citoesqueleto y la transcripción (**Foti *et al.*, 2001**). STT4 (phosphatidylinositol-4-kinase) es una proteína que actúa en el citoplasma o en la mitocondria de la célula eucariota, en la ruta de la proteínas quinasa Pkc1. Esta proteína se requiere para el mantenimiento de la morfología de la vacuola, la integridad de la pared celular y la organización del citoesqueleto de actina. Por otro lado, GLC7 se encuentra codificada por un gen esencial y actúa en el núcleo como subunidad catalítica de la proteína fosfatasa serina/treonina de tipo I y como componente del factor de poliadenilación y corte (CPF, del inglés Cleavage and Polyadenylation Factor). La proteína GLC7 está involucrada en diversos procesos, incluyendo el metabolismo del glucógeno, la esporulación y la mitosis. Además, se acumula en las proyecciones de apareamiento mediante la intervención de Afr1p. Ésto podría guardar relación con los

estudios realizados por **Zhang et al. (2011)**, autores que relacionaron NopL de NGR234 con la ruta de la respuesta a las feromonas de apareamiento, vía de señalización de MAPK bien conocida en levaduras (**apartado 1. 3. 1. Del Bloque 3 de Resultados**).

La secuenciación de las proteínas de origen vegetal que co-inmunoprecipitaron con NopP dio lugar a la identificación de proteínas relacionadas con los ácidos nucleicos (histona H4 o proteína DB10 del tipo helicasa de ARN dependiente de ATP), así como proteínas relacionadas con la inmunidad en plantas [ciclofilina 40 o proteína de resistencia (quinasa) o GRAS2] u otras de menor interés relacionadas con el metabolismo (**Tabla 25**). El hecho de que NopP se dirija al núcleo de la célula hospedadora disponiéndose en focos nucleares y que este efector pueda interactuar con ciertas proteínas relacionadas con el ADN y la inmunidad en plantas, podrían indicar que NopP actúa como un modulador de la expresión génica de la planta.

Las proteínas GRAS son específicas de las plantas y juegan numerosos papeles cruciales en el desarrollo y señalización y actúan como integradores de las señales generadas a partir de diversos estímulos procedentes del ambiente y de la regulación del crecimiento de la planta (**Xiaolin et al., 2012**). En las relaciones patogénicas, algunas proteínas de esta familia funcionan como promotores destinados a la activación de la expresión de genes de defensa. Algunos genes que codifican para este tipo de proteínas se utilizan como marcadores de la PTI, como por ejemplo, el gen *gras2* (**Peng et al., 2015**). Sin embargo, en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa se han desarrollado mecanismos específicos a partir de elementos existentes (como por ejemplo las proteínas de tipo GRAS) que tienen como finalidad el reconocimiento mutuo y la activación y desarrollo del proceso de nodulación. Así, tras la percepción de los factores Nod por parte de los receptores específicos de la planta se activan rutas de transducción de la señal llegando a desembocar en la activación de dos proteínas GRAS, NSP1 y NSP2, esenciales para el desarrollo y función del nódulo. Ambas proteínas juegan papeles muy diferentes, pero complementarios, en la señalización de los factores Nod y en la morfogénesis del nódulo. NSP1 es un factor de transcripción que se une directamente a los promotores de los genes de las nodulinas tempranas inducibles por factores Nod. Su actividad inductora depende de NSP2, el cual viaja desde el retículo endoplasmático de la envuelta nuclear hasta el núcleo para ejercer su función, relacionada con los genes *NIN* y *ENOD40* (**Kaló et al., 2005; Murakami et al., 2007; Smit et al., 2005; Xiaolin et al., 2012**). La posible interacción entre NopP y GRAS2 de

la planta de tabaco, proteína relacionada con la defensa en este organismo, podría indicar que en la interacción *Rhizobium*-leguminosa uno de los papeles de NopP podría ser la interacción con algún tipo de proteína GRAS para redirigir este tipo de proteínas a la activación de genes relacionados con la nodulación evitando la activación de genes de defensa.

Conclusiones

1. *S. fredii* HH103 genera una respuesta de defensa primaria en soja Williams, inducida posiblemente por las moléculas de superficie de la bacteria. Esta respuesta no depende del T3SS y no es lo suficientemente intensa como para bloquear el proceso de nodulación.
2. El T3SS de *S. fredii* HH103 inhibe la respuesta de defensa producida a través del reconocimiento de la estirpe por la soja, reduciendo los niveles de producción de SA. El T3SS interfiere sobre la ruta de señalización de las MAP quinasas MKK1-MKK2/2-MPK4, considerado como regulador negativo de la vía del SA.
3. La expresión de los genes específicos de los rizobios *nopC*, *nopI* y *nopL* de *S. fredii* HH103 se encuentra regulada por los flavonoides, NodD1 y TtsI. La mutación en estos genes no afecta a la secreción del resto de Nop.
4. NopC de *S. fredii* HH103 es un efector y es el principal responsable de la nodulación de *S. fredii* HH103 con *Lotus japonicus*.
5. La presencia de NopI repercute de forma positiva en las relaciones simbióticas entre *S. fredii* HH103 y las leguminosas ensayadas.
6. La presencia de NopL afecta de forma negativa a la simbiosis de *S. fredii* HH103 con leguminosas que forman nódulos determinados y de forma positiva a la simbiosis entre *S. fredii* HH103 y *S. tomentosa*, planta que presenta nódulos indeterminados.
7. La presencia de NopP afecta de forma negativa en la simbiosis de de *S. fredii* HH103 con soja Williams, mientras que actúa de forma positiva en la simbiosis entre esta estirpe y *S. tomentosa* y *V. unguiculata*.
8. La proteína NopL de *S. fredii* HH103 es fosforilada por una quinasa de la raíz de la soja. La cascada de señales que culmina en la fosforilación de NopL es dependiente de calcio y en ella participa al menos una MAPKK de tipo serina/treonina quinasa.
9. NopP de *S. fredii* HH103 es fosforilada por una quinasa de la raíz de la soja. La quinasa responsable de su fosforilación es de tipo serina/treonina y tirosina quinasa y es dependiente de calcio.

10. Las proteínas NopL y NopP de *S. fredii* HH103 se encuentran localizadas fundamentalmente en el núcleo de la célula hospedadora en forma de focos nucleares.
11. Los ensayos de inmunoprecipitación y/o de expresión en levaduras indican que NopP de *S. fredii* HH103 interacciona con proteínas relacionadas con los ácidos nucleicos y/o proteínas involucradas con en el sistema inmune, y que NopL de *S. fredii* HH103 interacciona con proteínas relacionadas con el retículo endoplasmático.

1. *S. fredii* HH103 activate an early defense response in soybean Williams, maybe induced by bacterial surface molecules. This response is not T3SS dependent and it is not enough strong to block the nodulation process.
2. *S. fredii* HH103 T3SS inhibit the defense response produced by the bacterial recognition by soybean root cells, reducing SA levels. T3SS interferes with MKK1-MKK2/2-MPK4 signalling pathway, considered a negative regulator of the SA pathway.
3. Expression of the rhizobial specific *nopC*, *nopI* and *nopL* genes from *S. fredii* HH103 is regulated by inducing flavonoid, NodD1 and TtsI. Mutation of any of these genes does not abolish secretion of the rest of Nops.
4. *S. fredii* HH103 NopC is a real effector responsible of the nodulation with *Lotus japonicus*.
5. NopI protein improves symbiotic parameters in the interaction between *S. fredii* HH103 and host legumes.
6. NopL protein negatively affects symbiotic parameters in the interaction between *S. fredii* HH103 and host legumes with determinated nodules, and positively with host legumes with indeterminated nodules.
7. NopP protein negatively affects symbiotic parameters in the interaction between *S. fredii* HH103 and soybean Williams, and positively with *S. tomentosa* y *V. unguiculata*.
8. *S. fredii* HH103 NopL protein is phosphorylated by a soybean root kinase. The signalling cascade that ends in NopL phosphorylation is calcium dependent. A serine/threonine MAPKK is a component of this pathway.
9. *S. fredii* HH103 NopP is phosphorylated by a soybean root kinase. The kinase responsible of this reaction is a serine/threonine and tyrosine kinase and it is calcium dependent.
10. *S. fredii* HH103 NopL and NopP proteins are located mainly in host cell nucleus forming nuclear spots.
11. Immunoprecipitations assays and/or yeast expression assays show that *S. fredii* HH103 NopP interacts with proteins related with nucleic acids and/or proteins involved

in the immune system. *S. fredii* HH103 NopL interacts with reticulum endoplasmic proteins.

Bibliografía

- Adie, B., Chico, J.M., Rubio-Somoza, I. y Solano, R. (2007) Modulation of plant defenses by ethylene. *J Plant Growth Regul* **26**: 160–177.
- Abby, S. y Rocha, E.P.C. (2012) The non-flagellar type III secretion system evolved from the bacterial flagellum and diversified into host-cell adapted systems. *PLoS Genet* **8**.
- Abramovitch, R.B., Janjusevic, R., Stebbins, C.E. y Martin, G.B. (2006) Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 2851–2856.
- Abrusci, P., Vergara-Irigaray, M., Johnson, S., Beeby, M.D., Hendrixon, D.R., Roversi, P., Friede, M.E., Deane, J.E., Jensen, G.J., Tang, C.M. y Lea, S.M. (2013) Architecture of the major component of the type III secretion system export apparatus. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 99–104.
- Aist, J.R. y Bushnell, W.R. (1991) pp: 321-345. Invasion of plants by powdery mildew fungi, and cellular mechanisms of the resistance. En *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. Plenum Press, Nueva York (EEUU).
- Aldon, D., Brito, B., Boucher, C. y Genin, S. (2000) A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *Eur Mol Biol Organ J* **19**: 2304-2314.
- Alfano, J.R. y Collmer, A. (1997) The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol* **179**: 5655-5662.
- Anderson, D.M., Feix, J.B, Monroe, A.L., Peterson, F.C., Volkman, B.F., Haas, H.L. y Frank, D.W. (2013) Identification of the major ubiquitin-binding domain of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU A2 Phospholipase. *Journal of Biological Chemistry* **288**: 26741–26752.
- Anderson, D.M., Fouts, D.E., Collmer, A. y Schneewind, O. (1999) Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 12839-12843.
- Anderson, L., Henderson, C. y Adachi, Y. (2001) Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage. *Molecular and cellular biology* **21**: 1719-1729.
- Annapurna, K. y Krishnan, H.B. (2003) Molecular aspects of soybean cultivar-specific nodulation by *Sinorhizobium fredii* USDA257. *Indian J Exp Biol* **41**: 1114-1123.

- Apel, K. y Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373-399.
- Arlat, M., Gough, C.L., Zischek, C., Barberis, P.A., Trigalet, A. y Boucher, C.A. (1992) Transcriptional organization and expression of the large *hrp* gene cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant-Microbe Interact* **5**: 187-193.
- Ashida, H., Kim, M., Schmidt-Supprian, M., Ma, A., Ogawa, M. y Sasakawa, C. (2010) A bacterial E3 ubiquitin ligase IpaH9.8 targets NEMO/IKK ϵ to dampen the host NF κ B-mediated inflammatory response. *Nat Cell Biol* **12**: 66-73.
- Asselbergh, B., De Vleeschauwer, D. y Hofte, M. (2008) Global switches and finetuning-ABA modulates plant pathogen defense. *Mol Plant-Microbe Interact* **21**: 709-719.
- Audhya, A. y Emr, S.D. (2002) Stt4 PI 4-kinase localizes to the plasma membrane and functions in the Pkc1-mediated MAP kinase cascade. *Dev Cell* **2**: 593-605.
- Ausmees, N., Kobayashi, H., Deakin, W.J., Marie, C., Krishnan, H.B., Broughton, W.J. y Perret, X. (2004) Characterization of NopP, a type III secreted effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *J Bacteriol* **86**: 4774-4780.
- Ausubel, F.M. (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunol* **6**: 973-979.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. (1994) pp: 1-24. Current protocols in molecular biology, Current Protocols, Nueva York (EEUU).
- Backert, S. y Selbach, M. (2005) Tyrosine-phosphorylated bacterial effector proteins: the enemies within. *Trends Microbiol* **13**: 476-484.
- Backert, S., Tegtmeyer, N. y Selbach, M. (2010) The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: the master key hypothesis. *Helicobacter* **15** 163-176.
- Bakker, E.G., Toomajian, C., Kreitman, M. y Bergelson, J.A. (2006) genome-wide survey of R gene polymorphisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 1803-1818.
- Baranski, O.A., Kalinichenko, V.V. y Adami, G.R. (2015) Increased FOXM1 expression can stimulate DNA repair in normal hepatocytes *in vivo* but also increases nuclear foci associated with senescence. *Cell proliferation* **48**: 105-115.

- Bartsev, A.V., Boukli, N.M., Deakin, W.J., Staehelin, C. y Broughton, W.J. (2003) Purification and phosphorylation of the effector protein NopL from *Rhizobium* sp. NGR234. *FEBS Lett* **554**: 271-274.
- Bartsev, A.V., Deakin, W.J., Boukli, N.M., McAlvin, C.B., Stacey, G., Malnoe, P., Broughton, W.J. y Staehelin, C. (2004) NopL, an effector protein of *Rhizobium* sp. NGR234, thwarts activation of plant defense reactions. *Plant Physiol* **134**: 871-879.
- Beauchamp, C. y Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**: 276-287.
- 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.
- Beckers, G.J.M. y Spoel, S.H. (2006) Fine-tuning plant defence signalling: Salicylate versus jasmonate. *Plant Biology* **8**: 1-10.
- Beers, R.F. y Sizer, I.W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* **195**: 133-140.
- Behringer, J.E. (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**: 188-198.
- Benabdillah, R., Mota, L.J., Lützelshwab, S., Demoinet, E. y Cornelis, G.R. (2004) Identification of a nuclear targeting signal in YopM from *Yersinia* spp. *Microb Pathog* **36**: 247-261.
- Berks, B.C. (1996) A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol* **22**: 393-404.
- Bernal-Bayard, J., Cardenal-Munoz, E. y Ramos-Morales, F. (2010) The *Salmonella* type III secretion effector, *Salmonella* leucine-rich repeat protein (SlrP), targets the human chaperone ERdj3. *J Biol Chem* **285**: 16360-16368.
- Bernal-Bayard, J. y Ramos-Morales, F. (2009) *Salmonella* type III secretion effector SlrP is an E3 ubiquitin ligase for mammalian thioredoxin. *J Biol Chem* **284**: 27587-27595.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A. y Solano, R. (2002) Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J* **29**: 23-32.

- Bierne, H. y Cossart, P. (2012) When bacteria target the nucleus: the emerging family of nucleomodulins. *Cellular Microbiology* **14**: 622–633.
- Block, A. y Alfano, J. (2011) Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Curr Opin Microbiol* **14**: 39–46.
- Boch, J. y Bonas, U. (2010) *Xanthomonas* AvrBs3 family type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol* **48**: 419–436.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A. y Bonas, U. (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **326**: 1509–1512.
- Bogdanove, A.J., Schornack, S. y Lahaye, T. (2010) TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 394–401.
- Bogsch, E.G., Sargent, F., Stanley, N.R., Berks, B.C., Robinson, C. y Palmer, T. (1998) An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *J Biol Chem* **273**: 18003-18006.
- Boller, T. y Felix, G. (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern- recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 379–406.
- Boogerd, F.C. y Van Rossum, D. (1997) Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. *FEMS Microbiol Rev* **21**: 5–27.
- Bosis, E., Salomon, D. y Sessa, G. (2011). A simple yeast-based strategy to identify host cellular processes targeted by bacterial effector proteins. **6**.
- Boudsocq, M. y Sheen, J. (2013) CDPKs in immune and stress signaling. *Trends in plant science* **18**: 30-40.
- Bowling, S.A., Guo, A., Cao, H., Gordon, S., Klessig, D.F. y Dong X. (1994). A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**: 1845–1857.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brencic, A., y Winans, S.C. (2005) Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 155-194.

- Broughton, W.J., Jabbouri, S. y Perret, X. (2000) Keys to symbiotic harmony. *J Bacteriol* **182**: 5641-5652.
- Buendía-Clavería, A.M., Moussaid, A., Ollero, F.J., Vinardell, J.M., Torres, A., Moreno, J., Gil-Serrano, A. M., Rodríguez-Carvajal, M.A., Tejero-Mateo, P., Peart, J.L., Brewin, N.J. y Ruiz-Sainz, J.E. (2003) A *purL* mutant of *Sinorhizobium fredii* HH103 is symbiotically defective and altered in its lipopolysaccharide. *Microbiology* **149**: 1807-1818.
- Burlinson, P., Knaggs, J., Hodgkin, J., Pears, C. y Preston, G.M. (2008) pp. 295-304. Interactions of pseudomonads with mushrooms and other eukaryotic hosts. En *Pseudomonas syringae Pathovars and Related Pathogens—Identification, Epidemiology and Genomics*. Springer Netherlands.
- Buschmann, C., Prehn, H. y Lichtenthaler, H. (1984) Photoacoustic spectroscopy (PAS) and its application in photosynthesis research. *Photosynth Res* **5**: 29-46.
- Buttner, D. y He, S. (2009) Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiol* **150**: 1656–64.
- Canonne, J., Marino, D., Jauneau, A., Pouzet, C., Brière, C., Roby, D. y Rivas, S. (2011) The *Xanthomonas* type III effector XopD targets the *Arabidopsis* transcription factor MYB30 to suppress plant defense. *The Plant Cell* **23**: 3498-3511.
- Chang, C., Damiani, I., Puppo, A. y Frendo, P. (2009) Redox changes during the legume–*Rhizobium* symbiosis. *Molecular plant* **2**: 370-377.
- Chevalier, D., Morris, E.R. y Walker, J.C. (2009) 14-3-3 and FHA domains mediate phosphoprotein interactions. *Annual review of plant biology* **60**: 67-91.
- Chippes, T.J., Gilmore, B., Myers, J.R. y Stotz, H.U. (2005) Relationship between oxalate, oxalate oxidase activity, oxalate sensitivity, and white mold susceptibility in *Phaseolus coccineus*. *Phytopathology* **95**: 292-299.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. y Staskawicz, B.J. (2006) Host–microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**: 803–814.
- Clarke, V.C., Loughlin, P.C., Gavrin, A., Chen, C., Brear, E.M., Day, D.A. y Smith, P.M.C. (2015) Proteomic analysis of the soybean symbiosome identifies new symbiotic proteins. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*.
- Cline, K., Ettinger, W.F. y Theg, S.M. (1992) Protein-specific energy requirements for protein transport across or into thylakoid membranes. Two luminal proteins are transported in the absence of ATP. *J Biol Chem* **267**: 2688-2696.

- Cordes, F.S., Komoriya, K., Larquet, E., Yang, S., Egelman, E.H., Blocker, A. y Lea, S.M. (2003) Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *J Biol Chem* **278**: 17103-17107.
- Cornelis, G.R., Boland, A., Boyd, A.P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M.P. y Stainier, I. (1998) The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1315-1352.
- Correa, V.R., Majerczak, D.R., Ammar, el-D., Merighi, M., Pratt, R.C, Hogenhout, S.A., Coplin, D.L. y Redinbaugh, M.G. (2012) The bacterium *Pantoea stewartii* uses two different type III secretion systems to colonize its plant host and insect vector. *Appl Environ Microbiol* **78**: 6327-36.
- Cortez, D. (2003) Caffeine inhibits checkpoint responses without inhibiting the Ataxia-Telangiectasia-mutated (ATM) and ATM- and Rad3-related (ATR) Kinases. *J Biol Chem* **278**: 37139-37145.
- Couch, B.C., Spangler, R., Ramos, C. y May, G. (2006) Pervasive purifying selection characterizes the evolution of *I2* homologs. *Mol Plant-Microbe Interact* **19**: 288-303.
- Christie, P.J. y Vogel, J.P. (2000) Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends in microbiology* **8**: 354-360.
- Cui, H., Wang, Y., Xue, L., Chu, J., Yan, C., Fu, J., Chen, M., Innes, R.W. y Zhou, J.M. (2010) *Pseudomonas syringae* effector protein AvrB perturbs *Arabidopsis* hormone signaling by activating MAP kinase 4. *Cell Host Microbe* **7**: 164-175.
- Culligan, K., Tissier, A. y Britta, A. (2004) ATR regulates a G2-phase cell-cycle checkpoint in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **16**: 1091-1104.
- Curak, J., Rohde, J. y Stagljar, I. (2009) Yeast as a tool to study bacterial effectors. *Curr Opin Microbiol* **12**: 18-23.
- Dai, W.J., Zeng, Y., Xie, Z.P. y Staehelin, C. (2008) Symbiosis-promoting and deleterious effects of NopT, a novel type 3 effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Journal of bacteriology* **190**: 5101-5110.
- Dangl, J.L. y Jones, J.D.G. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826-833.
- Dautin, N. y Bernstein, H.D. (2007) Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol* **61**: 89-112.

- DeFraia, C.T., Schmelz, E.A. y Mou, Z. (2008) A rapid biosensor-based method for quantification of free and glucose-conjugated salicylic acid. *Plant Methods* **4**: 28.
- Deakin, W.J. y Broughton, W.J. (2009) Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nature Reviews Microbiology* **7**: 312-320.
- Deakin, W.J., Marie, C., Saad, M., Krishnan, H.B. y Broughton, W.J. (2005) NopA is associated with cell surface appendages produced by the type III secretion system of *Rhizobium* sp. NGR234. *Mol Plant-Microbe Interact* **18**: 499-507.
- Dedhar, S. (1994) Novel functions for calreticulin: interaction with integrins and modulation of gene expression? *Trends Biochem Sci* **19**: 269–271.
- Delamuta, J.R., Ribeiro, R.A., Ormeño-Orrillo, E., Melo, I.S., Martínez-Romero, E., y Hungria, M. (2013) Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**: 3342-3351.
- Delledone, M. (2005) NO news is good news for plants. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 390-396.
- 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.
- Deslandes, L. y Rivas, S. (2011) The plant cell nucleus: A true arena for the fight between plants and pathogens. *Plant Signal Behav* **6**: 42–48.
- Desvaux, M., Hebraud, M., Talon, R. y Henderson, I.R. (2009) Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol* **17**: 139–145.
- D’Haeze, W. y Holsters, M. (2002) Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* **12**: 79-105.
- Diaz, J., ten Have, A. y Van Kan, J.A. (2002) The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol* **129**: 1341–1351.
- Dietrich, R.A., Richberg, M.H., Schmidt, R., Dean, C. y Dangl, J.L. (1997) A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* LSD1 gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell* **88**: 685–694.

- Ding, Y. y Oldroyd, G.E.D. (2009) Positioning the nodule, the hormone dictum. *Plant Signaling & Behavior* **4**: 89-93.
- Dodds, P.N., Rathjen, J.P. (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* **11**: 539–548.
- Dong, X. (2004) NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 547-552.
- Dowdle, S.F. y Bohlool, B.B. (1985) Predominance of fast growing *Rhizobium japonicum* in a soybean field in the People's Republic of China. *Appl Environ Microbiol* **50**: 1171-1176.
- Downie, J.A. (2010) The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 150–170.
- Driks, A. y DeRosier, D. (1990) Additional structures associated with bacterial flagellar basal body. *J Mol Biol* **211**: 669–672.
- Durner, J., Shah, J. y Klessig, D.F. (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* **2**: 266–277.
- Durrant, W.E. y Dong, X. (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **42**: 185-209.
- Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K. y Pikaard, C.S. (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal* **45**: 616–629.
- Emerich, D.W. y Krishnan, H.B. (2014) Symbiosomes: temporary moonlighting organelles. *Biochem J* **460**: 1–11.
- Enyedi, A.J., Yalpani, N., Silverman, P. y Raskin, I. (1992) Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2480–2484.
- Epier, C., Dickenson, N., Bullitt, E., Picking, W. (2012) Ultrastructural analysis of IpaD at the tip of the nascent MxiH type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *J Mol Biol* **420**: 29–39.
- Erbs, G. y Newman, M.A. (2012) The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan, two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs), in plant innate immunity. *Mol Plant Pathol* **13**: 95–104.

- Etalo, D.W., Stulemeijer, I.J., van Esse, H.P., de Vos, R.C., Bouwmeester, H.J. y Joosten, M.H. (2013) System-wide hypersensitive response-associated transcriptome and metabolome reprogramming in tomato. *Plant physiology* **162**: 1599-1617.
- Evangelisti, E., Rey, T. y Schornack, S. (2014) Cross-interference of plant development and plant-microbe interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **20**: 118-126.
- Farazi, T.A., Waksman, G. y Gordon, J.I. (2001) The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J Biol Chem* **276**: 39501-39504.
- Fett, W.F. y Sequeira, L. (1981) Further characterization of the physiologic races of *Pseudomonas glycinea*. *Canadian journal of Botany* **59**: 283-287.
- Felix, G. y Boller, T. (2003) Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J Biol Chem* **278**: 6201-6208.
- Feng, F. y Zhou, J. (2012) Plant-bacterial pathogen interactions mediated by type III effectors. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 469-476.
- Ferguson, B.J. y Mathesius, M. (2014) Phytohormone regulation of legume-rhizobia interactions. *J Chem Ecol* **40**: 770-790.
- Feys, B. y Parker, J.E. (2000) Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet* **16**: 449-455.
- 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.
- Fisher, R.F., Egelhoff, T.T., Mulligan, J.T. y Long, S.R. (1988) Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free extracts containing NodD to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. *Genes Dev* **2**: 282-293.
- Foti, M., Audhya, A. y Emr, S.D. (2001) Sac1 lipid phosphatase and Stt4 phosphatidylinositol 4-kinase regulate a pool of phosphatidylinositol 4-phosphate that functions in the control of the actin cytoskeleton and vacuole morphology. *Molecular biology of the cell* **12**: 2396-2411.
- Francis, M. S., Wolf-Watz, H. y Forsberg, A. (2002) Regulation of type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol* **5**: 166-172.

- Frankel, G., Phillips, A.D., Rosenshine, I., Dougan, G., Kaper, J.B. y Knutton, S. (1998) Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* **30**: 911-921.
- Fraysse, N., Couderc, F. y Poinsot, V. (2003) Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Eur J Biochem* **270**: 1365-1380.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W.J., Rosenthal, A., y Perret, X. (1997) Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* **387**: 394-401.
- Gabriel, D.W. y Rolfe, B.G. (1990) Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. *Annu Rev Phytopathol* **28**: 365-391.
- Gage, D.J. (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 280-300.
- Galán, J.E. (2007) SnapShot: effector proteins of type III secretion systems. *Cell* **130**: 192.
- Galán, J.E. (2009) Common themes in the design and function of bacterial effectors. *Cell Host Microbe* **5**: 571-79.
- Galán, J.E. y Collmer, A. (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**: 1322-1328.
- Galán, J.E., Ginocchio, C. y Costeas, P. (1992) Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *InvA* to members of a new protein family. *J Bacteriol* **17**: 4338-4349.
- Galán, J.E., Lara-Tejero, M., Marlovits, T.C. y Wagner, S. (2014) Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annu Rev Microbiol* **68**: 415-438.
- Galkin, V., Schmied, W., Schriadt, O., Marlovits, T. y Egelman, E. (2010) The structure of the *Salmonella typhimurium* type III secretion system needle shows divergence from the flagellar system. *J Mol Biol* **396**: 1392-1397.
- Garcia, A.V., Charrier, A., Schikora, A., Bigeard, J., Pateyron, S., de Tauzia-Moreau, M.L., Evrard, A., Mithöfer, A., Martin-Magniette, M.L., Virlogeux-Payant, I. y Hirt, H. (2014) *Salmonella enterica* flagellin is recognized via FLS2 and activates PAMP-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant* **7**: 657-674.

- Gendrin, C., Contreras-Martel, C., Bouillot, S., Elsen, S., Lemaire, D., Skoufias, D. A., Huber, P., Attree, I. y Dessen, A. (2012) Structural basis of cytotoxicity mediated by the type III secretion toxin ExoU from *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* **8**.
- Geurts, R. y Bisseling, T. (2002) *Rhizobium* Nod factor perception and signalling. *Plant Cell supplement* **14**: 239-249.
- Geurts, R., Fedorova, E. y Bisseling, T. (2005) Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 647 346-352.
- Ghosh, P. (2004) Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 771–795.
- Giraud, E. (2007) Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science* **316**: 1307–1312.
- Glazebrook, J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 205–227.
- Gleason, C., Chaudhuri, S., Yang, T., Munoz, A., Poovaiah, B.W. y Oldroyd, G.E. (2006) Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* **441**: 1149-1152.
- Glew, M.D., Veith, P.D., Peng, B., Chen, Y., Gorasia, D.G., Yang, Q., Slakeski, N., Chen, D., Moore, C., Crawford, S. y Reynolds, E.C. (2012) PG0026 is the C-terminal signal peptidase of a novel secretion system of *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* **287**: 24605–24617.
- Godiard, L., Niebel, A., Micheli, F., Gouzy, J., Ott, T. y Gamas, P. (2007) Identification of new potential regulators of the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis using a large-scale suppression subtractive hybridization approach. *Mol Plant-Microbe Interact* **20**: 321-32.
- Goff, S.A. Ricke, D., Lan, T.H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchison, D., Martin, M., Katagiri, F., Lange, B.M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., Zhong, J., Miguel, T., Paszkowski, U., Zhang, S., Colbert, M., Sun, W.L., Chen, L., Cooper, B., Park, S., Wood, T.C., Mao, L., Quail, P., Wing, R., Dean, R., Yu, Y., Zharkikh, A., Shen, R., Sahasrabudhe, S., Thomas, A., Cannings, R., Gutin, A., Pruss, D., Reid, J., Tavtigian, S., Mitchell, J., Eldredge, G., Scholl, T., Miller, R.M., Bhatnagar, S., Adey, N., Rubano, T., Tusneem, N., Robinson, R., Feldhaus, J., Macalima, T., Oliphant, A. y Briggs, S. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* **296**: 92–100.

- Gomez-Gomez, L. y Boller, T. (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* **5**: 1003–1011.
- Gomez-Gomez, L. y Boller, T. (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci* **7**: 251–256.
- Göttfert, M., Röthlisberger, S., Kündig, C., Beck, C., Marty, R., y Hennecke, H. (2001) Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA región of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *J Bacteriol* **183**: 1405–1412.
- Gourion, B., Berrabah, F., Ratet, P. y Stacey, G. (2014) *Rhizobium*-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends Plant Sci*
- Grant, M.R. y Jones, J.D. (2009) Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science* **324**: 750-752.
- 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.
- Guo, L., Groenendyk, J., Papp, S., Dabrowska, M., Knoblach, B., Kay, C., Parker, J.M., Opas, M. y Michalak, M. (2003) Identification of an N-domain histidine essential for chaperone function in calreticulin. *J Biol Chem* **278**: 50645–50653.
- Haglund, K. y Dikic, I. (2005) Ubiquitylation and cell signaling. *Eur Mol Biol Organ J.* **24**: 3353–3359.
- Harrigan, J.A., Belotserkovskaya, R., Coates, J., Dimitrova, D.S., Polo, S.E., Bradshaw, C.R., Fraser, P. y Jackson, S.P. (2011) Replication stress induces 53BP1- containing OPT domains in G1 cells. *J Cell Biol* **193**: 97–108.
- Hayashi, M., Saeki, Y., Haga, M., Harada, K., Kouchi, H. y Umehara, Y. (2012) *Rj (rj)* genes involved in nitrogen-fixing root nodule formation in soybean. *Breed Sci* **61**: 544-553.
- Hayashi, T., Morohashi, H. y Hatakeyama, M. (2013) Bacterial EPIYA effectors – Where do they come from? What are they? Where are they going?. *Cell Microbiol* **15**: 377–385.
- He, P., Shan, L. y Sheen, J. (2007). Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant–microbe interactions. *Cellular microbiology* **9**: 1385-1396.

- He, S.Y., Nomura, K. y Whittam, T.S. (2004) Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 181–206.
- Heal, K.G., McConkey, G.A., Hormaeche, C.E., Hollingdale, M.R., Khan, C.M.A. y Taylor-Robinson, A.W. (2000) Recovery of protein kinases from renatured SDS-polyacrylamide gels for biochemical studies. *BioTechniques* **28**: 232-238.
- Heinrich, M., Baldwin, I.T. y Wu, J. (2012) Protein kinases in plant growth and defense. *Endocytobiosis and Cell Research* **22**: 48-51.
- Hicke, L. y Dunn, R. (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 141–172.
- Hicks, S.W., Charron, G., Hang, H.C. y Galán, J.E. (2011) Subcellular targeting of *Salmonella* virulence proteins by host-mediated S-palmitoylation. *Cell Host Microbe* **10**: 9–20.
- Hicks, S.W. y Galán, J.E. (2013) Exploitation of eukaryotic subcellular targeting mechanisms by bacterial effectors. *Nature* **11**: 316-326.
- Hoffman, T., Schmidt, J.S., Zheng, X. y Bent, A.F. (1999) Isolation of ethylene-insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance. *Plant Physiology* **119**: 935-950.
- Hotson, A., Chosed, R., Shu, H., Orth, K. y Mudgett, M.B. (2003) *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Mol Microbiol* **50**: 377-389.
- Huang, W.E., Huang, L., Preston, G.M., Martin, N., Carr, J.P., Yanhong, L., Singer, A.C., Whiteley, A.S. y Hui, W. (2006) Quantitative in situ assay of salicylic acid in tobacco leaves using a genetically modified biosensor strain of *Acinetobacter* sp. ADP1. *Plant Journal* **46**: 1073-1083.
- 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.
- Hueck, C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433.
- Hynds, P.J., Robinson, D. y Robinson, C. (1998) The sec-independent twin-arginine translocation system can transport both tightly folded and malfolded proteins across the thylakoid membrane. *J Biol Chem* **273**: 34868-34874.

- Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Kreisc, M., Zhangd, S., Hirte, H., Wilson, C., Heberle-Borse, E., Ellisf, B.E., Morrisg, P.C., Inness, R.W., Eckerri, J.R., Scheelj, D., Klessigk, D.F., Machidal, Y., Mundy, J., Ohashin, Y., Walkero, J.C. y Grupo MAPK (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in plant science* **7**: 301-308.
- Innes, R.W. (2004) Guarding the goods. New insights into the central alarm system of plants. *Plant Physiol* **135**: 695-701.
- Ito, K. y Mori, H. (2009) pp. 3-22. The Sec Protein Secretion System. En K. Wooldridge (ed.). Bacterial secreted proteins: secretory mechanisms and role in pathogenesis. Caster Academic Press., Norfolk (Inglaterra).
- Jamir, Y., Guo, M., Oh, H.S., Petnicki-Ocwieja, T., Chen, S., Tang, X., Dickman, M.B., Collmer, A. y Alfano, J.R. (2004) Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. *Plant J* **37**: 554-565.
- Jenner, C., Hitchin, E., Mansfield, J., Walters, K., Betteridge, P., Teverson, D. y Taylor, J. (1991) Gene-for-gene interactions between *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Phaseolus*. *Mol Plant-Microbe Interact* **4**: 553-562.
- Jia, X.Y., He, L.H, Jing, R.L. y Li, R.Z. (2009) Calreticulin: conserved protein and diverse functions in plants. *Physiologia Plantarum* **136**: 127-138.
- Jia, X.Y., Xu, C.Y., Jing, R.L., Li, R.Z., Mao, X.G., Wang, J.P. y Chang, X.P. (2008) Molecular cloning and characterization of wheat calreticulin (CRT) gene involved in drought-stressed responses. *J Exp Bot* **59**: 739-751.
- Jones, J.D.G. y Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329.
- Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M.E. y Walker, G.C. (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* **5**: 619-633.
- Kalman, S., Mitchell, W., Marathe, R., Lammel, C. y Fan, L. (2000) Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nat Genet* **21**: 385-389.
- Kaló, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R.M., Hirsch, S., Jakab, J., Sims, S., Long, S.R., Rogers, J., Kiss, J.B., Downie, J.A. y Oldroyd, G.E. (2005) Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* **308**: 1786-1789.

- Kambara, K., Ardisson, 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.
- 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.
- Kapuscinski, J. y Skoczylas, B. (1977) Simple and rapid fluorimetric method for DNA microassay. *Anal Biochem* **83**: 252-257.
- Keen, N.T. (1990) Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu Rev Genet* **24**: 447-463.
- Kerscher, O., Felberbaum, R. y Hochstrasser, M. (2006) Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 159–180.
- Kim, J.G., Taylor, K.W., Hotson, A., Keegan, M., Schmelz, E.A. y Mudgetta, M.B. (2008) XopD SUMO protease affects host transcription, promotes pathogen growth, and delays symptom development in *Xanthomonas*-infected tomato leaves. *The Plant Cell* **20**: 1915–1929.
- Kim, M.G., da Cunha, L., McFall, A.J., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J.L., Mackey, D. (2005) Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. *Cell* **121**: 749–759.
- Kinkema, M. y Gresshoff, P.M. (2008) Investigation of downstream signals of the soybean autoregulation of nodulation receptor kinase GmNARK. *Mol Plant-Microbe Interact* **21**: 1337-1348.
- Knoester, M., van Loon, L.C., van den Heuvel, J., Hennig, J., Bol, J.F. y Linthorst, H.J. (1998) Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 1933–1937.
- Knutton, S., Rosenshine, I., Pallen, M.J., Nisan, I., Neves, B.C., Bain, C., Wolff, C., Dougan, G. y Frankel, G. (1998) A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *Eur Mol Biol Organ J* **17**: 2166–76.
- Koebnik, R. (2001) The role of bacterial pili in protein and DNA translocation. *Trends Microbiol* **9**: 586-590.

- 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.
- Kosetsu, K., Matsunaga, S., Nakagami, H., Colcombet, J., Sasabe, M., Soyanoa, T., Takahashia, Y., Hirtc, H. y Machida, Y. (2010) The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**: 3778–3790.
- Kosslak, R.M. y Bohlool, B.B. (1984) Supression of nodule development of one side of a split root system of soybeans caused by prior inoculation of the other side. *Plant Physiol* **75**: 125-130.
- 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. (2002) NolX of *Sinorhizobium fredii* USDA257, a type III-secreted protein involved in host range determination, is localized in the infection threads of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp) and soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) nodules. *J Bacteriol* **184**: 831-839.
- 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.
- Krishnan, H.B. y Pueppke, S.G. (1993) Flavonoid inducers of nodulation genes stimulate *Rhizobium fredii* USDA257 to export proteins into the environment. *Mol Plant-Microbe Interact* **6**: 107-113.
- Krishnan, H.B. y Pueppke, S.G. (1994) Cultivar-specificity genes of the nitrogen-fixing soybean symbiont, *Rhizobium fredii* USDA257, also regulate nodulation of *Erythrina* spp. *American journal of botany* 38-45.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galán, J.E. y Aizawa, S.I. (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**: 602–605.

- Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S.I. y Galán, J.E. (2000) Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 10225–10230.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lastdrager, J., Hanson, J. y Smeekens, S. (2014) Sugar signals and the control of plant growth and development. *J Exp Bot* **65**: 799–807.
- Lee, S.H. y Galán, J.E. (2004) *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol Microbiol* **51**: 483–95.
- Lee, V.T. y Schneewind, O. (2001) Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Develop* **15**: 1725-1752.
- Lewis, J.D., Abada, W., Ma, W., Guttman, D.S. y Desveaux, D. (2008) The HopZ family of *Pseudomonas syringae* type III effectors require myristoylation for virulence and avirulence functions in *Arabidopsis thaliana*. *J Bacteriol* **190**: 2880–2891.
- Lian, B., Zhou, X., Miransari, M. y Smith, D.L. (2000) Effects of salicylic acid on the development and root nodulation of soybean seedlings. *Journal of Agronomy and Crop Science* **185**: 187-192.
- Liang, Y., Cao, Y., Tanaka, K., Thibivilliers, S., Wan, J., Choi, J., Kang, C.H., Qiu, J., Stacey, G. (2013) Nonlegumes respond to rhizobial Nod factors by suppressing the innate immune response. *Science* **341**: 1384-1387.
- Li, W., Yadeta, K.A., Elmore, J.M. y Coaker, G. (2013) The *Pseudomonas syringae* effector HopQ1 promotes bacterial virulence and interacts with tomato 14-3-3 proteins in a phosphorylation-dependent manner. *Plant physiology* **161**: 2062-2074.
- Li, Y., Tian, C.F., Chen, W.F., Wang, L., Sui, X.H. y Chen, W.X. (2013) High-resolution transcriptomic analyses of *Sinorhizobium* sp. NGR234 bacteroids indeterminate nodules of *Vigna unguiculata* and indeterminate nodules of *Leucaena leucocephala*. *PLoS ONE* **8**.
- Linder, M.E. y Deschenes, R.J. (2007) Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nature Rev Mol Cell Biol* **8**: 74–84.
- Liu, J., Elmore, J.M., Lin, Z.J.D. y Coaker, G. (2011) A receptor-like cytoplasmic kinase phosphorylates the host target RIN4, leading to the activation of a plant innate immune receptor. *Cell Host Microbe* **9**: 137–146.

- Liu, J.Z., Braun, E., Qiu, W.L., Shi, Y.F., Marcelino-Guimarães, F.C., Navarre, D., Hilland, J.H. y Whitham, S.A. (2014) Positive and negative roles for soybean MPK6 in regulating defense responses. *Mol Plant-Microbe Interact* **27**: 824–834.
- Liu, J.Z. y Whitham, S.A. (2013) Overexpression of a soybean nuclear localized type–III DnaJ domain-containing HSP40 reveals its roles in cell death and disease resistance. *The Plant Journal* **74**: 110–121.
- Lohar, D.P. y Bird, D.M. (2003) *Lotus japonicus*: A new model to study root-parasitic nematodes. *Plant Cell Physiol* **44**: 1176–1184.
- Long, S.R. y Ehrhardt, D.W. (1989) New route to a sticky subject. *Nature* **338**: 545–546.
- López-Baena, F.J. (2008) Las proteínas Nop de *Sinorhizobium fredii* HH103: regulación e implicación en la simbiosis con la soja (*Glycine max* [L.] Merrill). Tesis doctoral.
- López-Baena, F.J., Monreal, J.A., Pérez-Montaño, F., Guasch-Vidal, B., Bellogín, R.A., Vinardell, J.M. y Ollero, F.J. (2009) The absence of Nops secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103 increases *GmPRL* expression in Williams soybean. *Mol Plant-Microbe Interact* **22**: 1445–1454.
- López-Baena, F.J., Vinardell, J.M., Pérez-Montaño, F., Crespo-Rivas, J.C., Bellogín, R.A., Espuny, M del R. y Ollero, F.J. (2008) Regulation and symbiotic significance of nodulation outer proteins secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103. *Microbiology* **154**: 1825–1836.
- Loquet, A., Sgourakis, N., Gupta, R., Giller, K., Riedel, D., Goosmann, C., Griesinger Kolbe, C.M., Baker, D., Becker, S. y Lange, A. (2012) Atomic model of the type III secretion system needle. *Nature* **486**: 276–279.
- Lorenzo, O. y Solano, R. (2005) Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 532–540.
- Lukas, C., Savic, V., Bekker-Jensen, S., Doil, C., Neumann, B., Pedersen, R.S., Grøfte, M., Chan, K.L., Hickson, I.D., Bartek, J. y Lukas, J. (2011) 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat Cell Biol* **13**: 243–253.
- Luo, L y Lu D. (2014) Immunosuppression during Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Signal Behav* **9**.

- Lu, D.P., Lin, W.W., Gao, X.Q., Wu, S.J., Cheng, C., Avila, J., Heese, A., Devarenne, T.P., He, P. y Shan, L. (2011) Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity. *Science* **332**: 1439–1442.
- Mabood, F. y Smith, D.L. (2005) Pre-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* with jasmonates accelerates nodulation and nitrogen fixation in soybean (*Glycine max*) at optimal and suboptimal root zone temperatures. *Physiol Plant* **125**: 311–323.
- Mabood, F., Souleimanov, A., Khan, W. y Smith, D.L. (2006) Jasmonates induce Nod factor production by *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiol Biochem* **44**: 759–765.
- Madinabeitia, N., Bellogín, R.A., Buendía-Clavería, A.M., Camacho, M., Cubo, T., Espuny, M.R., Gil-Serrano, A.M., de Lyra, M.C.C., Moussaid, A., Ollero, F.J., Soria-Díaz, M.E., Vinardell, J.M., Zeng, J. y Ruiz-Sainz, J.E. (2002) *Sinorhizobium fredii* HH103 has a truncated *nolO* gene due to a -1 frameshift mutation that is conserved among other geographically distant *S. fredii* strains. *Mol Plant-Microbe Interact* **15**: 150-159.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1982) En *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, Nueva York (EEUU).
- Marenda, M., Brito, B., Callard, D., Genin, S., Barberis, P., Boucher, C., y Arlat, M. (1998) PrhA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes in the presence of plant cells. *Mol Microbiol* **27**: 437-453.
- Marie, C., Broughton, W.J. y Deakin, W.J. (2001) *Rhizobium* type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Curr Opin Plant Biol* **4**: 336-342.
- Marie, C., Deakin, W.J., Ojanen-Reuhs, T., Diallo, E., Reuhs, B., Broughton, W.J. y Perret, X. (2004) TtsI, a key regulator of *Rhizobium* species NGR234 is required for type III-dependent protein secretion and synthesis of rhamnose-rich polysaccharides. *Mol Plant-Microbe Interact* **17**: 958-966.
- Marie, C., Deakin, W.J., Viprey, V., Kopcinska, J., Golinowski, W., Krishnan, H.B., Perret, X. y Broughton, W.J. (2003) Characterisation of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. *Mol Plant-Microbe Interact* **16**: 743-751.
- Marsh, J.F., Rakocevic, A., Mitra, R.M., Brocard, L., Sun, J., Eschstruth, A., Long, S.R., Schultze, M., Ratet, P. y Oldroyd, F.E.D. (2007) *Medicago truncatula* NIN is

- essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin dependent protein kinase. *Plant Physiology* **144**: 324-335.
- Martinez-Abarca, F., Herrera-Cervera, J.A., Bueno, P., Sanjuan, J., Bisseling, T. y Olivares, J. (1998) Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti*-Alfalfa symbiosis. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**: 153-155.
- Mattaj, I.W. y Englmeier, L. (1998) Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* **67**: 265-306.
- Mauch-Mani, B. y Mauch, F. (2005) The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 409-414.
- Maunoury, N., Redondo-Nieto, M., Bourcy, M., Van de Velde, W., Alunni, B., Laporte, P., Durand, P., Agier, N., Marisa, L., Vaubert, D., Delacroix, H., Duc, G., Ratet, P., Aggerbeck, L., Kondorosi, E. y Mergaert, P. (2010) Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in *Medicago truncatula* nodulation are coupled to two transcriptome-switches. *PLoS One* **5**.
- Mazarei, M., Elling, A.A., Maier, T.R., Puthoff, D.P. y Baum, T.J. (2007) GmERE1BP1 is a transcription factor activating defense genes in soybean and *Arabidopsis*. *Mol Plant-Microbe Interact* **20**: 107-119.
- McLaughlin, L.M., Govoni, G.R., Gerke, C., Gopinath, S., Peng, K., Laidlaw, G., Chien, Y.H., Jeong, H.W., Li, Z., Brown, M.D., Sacks, D.B. y Monack, D. (2009) The *Salmonella* SPI2 effector SseI mediates long-term systemic infection by modulating host cell migration. *PloS ONE* **5**.
- Meinhardt, L.W., Krishnan, H.B., Balatti, P.A. y Pueppke, S.G. (1993) Molecular cloning and characterization of a sym plasmid locus that regulates cultivar-specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. *Mol Microbiol* **2**: 17-29.
- Meng, M. y Zhang, S. (2013) MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling. *Annu Rev Phytopathol* **51**: 245-266.
- Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H. y Michelmore, R.W. (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**: 809-834.
- Miller, J.B., Pratap, A., Miyahara, A., Zhou, L., Bornemann, S., Morris, R.J., Oldroyd, G.E. (2013) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase is negatively and positively regulated by calcium, providing a mechanism for decoding calcium responses during symbiosis signaling. *Plant Cell* **25**: 5053-5066.

- Millet, Y.A., Danna, C.H., Clay, N.K., Songnuan, W., Simon, M.D., Werck-Reichhart, D. y Ausubel, F.M. (2010) Innate immune responses activated in *Arabidopsis* roots by microbe-associated molecular patterns. *The Plant Cell Online* **22**: 973-990.
- Minami, E., Kouchi, H., Carlson, R.W., Cohn, J.R., Kolli, V.K., Day, R.B., Ogawa, T. y Stacey, G. (1996) Cooperative action of lipo-chitin nodulations signals on the induction of the early nodulin, ENOD2, in soybean roots. *Mol Plant-Microbe Interact* **9**: 574-583.
- Mitra, R.M. y Long, S.R. (2004) Plant and bacterial symbiotic mutants define three transcriptionally distinct stages in the development of the *Medicago truncatula*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Plant Physiol* **134**: 595-604.
- Monaghan, J. y Zipfel, C. (2012) Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 349-357.
- Monshausen, G.B., Bibikova, T.N., Messerli, M.A., Shi, C. y Gilroy, S. (2007) Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 20996-21001.
- Moreau, S., Verdenaud, M., Ott, T., Letort, S., de Billy, F., Niebel, A., Gouzy, J., de Carvalho-Niebel, F. y Gamas, P. (2011) Transcription reprogramming during root nodule development in *Medicago truncatula*. *PLoS One* **6**.
- Mukaihara, T. y Tamura, N. (2009) Identification of novel *Ralstonia solanacearum* type III effector proteins through translocation analysis of *hrpB*-regulated gene products. *Microbiology* **155**: 2235-2244.
- Murakami, Y., Miwa, H., Imaizumi-Anraku, H., Kouchi, H., Downie, J.A., Kawaguchi, M. y Kawasaki, S. (2007) Positional cloning identifies *Lotus japonicus* NSP2, a putative transcription factor of the GRAS family, required for *NIN* and *ENOD40* gene expression in nodule initiation. *DNA research* **13**: 255-265.
- Nakagawa, T. y Kawaguchi, M. (2006) Shoot-applied MeJA suppresses root nodulation in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol* **47**: 176-180.
- Nakamura, S., Hayashi, H., Mori, S. y Chino, M. (1995) Detection and characterization of protein kinases in rice phloem sap. *Plant Cell Physiol* **36**: 19-27.
- Neill, S., Desikan, R. y Hancock, J. (2002) Hydrogen peroxide signalling. *Current opinion in plant biology* **5**: 388-395.

- Nguyen, L., Paulsen, I.T., Tchieu, J., Hueck, C.J. y Saier, M.H. Jr. (2000) Phylogenetic analyses of the constituents of Type III protein secretion systems. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**: 125-144.
- Nimchuk, Z., Marois, E., Kjemtrup, S., Leister, R.T., Katagiri, F. y Dangl, J.L. (2000) Eukaryotic fatty acylation drives plasma membrane targeting and enhances function of several type III effector proteins from *Pseudomonas syringae*. *Cell* **101**: 353–363.
- Oh, C.S. y Martin, G.B. (2011) Effector-triggered immunity mediated by the Pto kinase. *Trends Plant Sci* **16**: 132–140.
- Okazaki, S., Kaneko, T., Sato, S. y Saeki, K. (2013) Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 17131-17136.
- Okazaki, S., Okabe, S., Higashi, M., Shimoda, Y., Sato, S., Tabata, S., Hashiguchi, M., Akashi, R., Göttfert, M. y Saeki, K. (2010) Identification and functional analysis of type III effector proteins in *Mesorhizobium loti*. *Mol Plant-Microbe Interact* **23**: 223–234.
- Okazaki, S., Zehner, S., Hempel, J., Lang, K. y Göttfert, M. (2009) Genetic organization and functional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii*. *FEMS Microbiol Lett* **295**: 88-95.
- Oldroyd, G. (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature* **11**: 252-263.
- Oldroyd, G. y Downie, J. (2004) Calcium, kinases and nodulation signaling in legumes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 566–576.
- Oldroyd, G., Murray, J.D, Poole, P.S. y Downie, J.A. (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics* **45**: 119-144.
- Orth, K. (2002) Function of the *Yersinia* effector YopJ. *Curr Opin Microbiol* **5**: 38–43.
- Pallen, M., Beatson, S. y Bailey, C. (2005) Bioinformatics, genomics and evolution of non-flagellar type-III secretion systems: a Darwinian perspective. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 201–29.
- Palma, F., López-Gómez, M., Tejera, N.A. y Lluch, C. (2014) Involvement of abscisic acid in the response of *Medicago sativa* plants in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* to salinity. *Plant Sci* **223**: 16-24.

- Papanikou, E., Karamanou, S. y Economou, A. (2007) Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat Rev Microbiol* **5**: 839-851.
- Parniske, M., Zimmermann, C., Cregan, P.B. y Werner, D. (1990) Hypersensitive reaction of nodule cells in the *Glycine* sp./*Bradyrhizobium japonicum*-symbiosis occurs at the genotype-specific level. *Botanica acta* **103**: 143-148.
- Patel, J.C. y Galán, J.E. (2006) Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J Cell Biol* **175**: 453-463.
- Patriarca, E.J., Tatè, R., Ferraioli, S. e Iaccarino, M. (2004) Organogenesis of the legume root nodules. *Int Rev Citol* **234**: 201-262.
- Peleg-Grossman, S., Golani, Y., Kaye, Y., Melamed-Book, N. y Levine, A. (2009) NPR1 protein regulates pathogenic and symbiotic interactions between *Rhizobium* and legumes and nonlegumes. *PLoS One* **4**.
- Peng, K.C., Wang, C.W., Wu, C.H., Huang, C.T. y Liou, R.F. (2015) Tomato SOBIR1/EVR homologs are involved in elicitor perception and plant defense against the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.
- Perret, X., Freiberg, C., Rosenthal, A., Broughton, W.J. y Fellay, R. (1999) High-resolution transcriptional analysis of the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. *Mol Microbiol* **32**: 415-425.
- Pitzschke, A., Djamei, A., Bitton, F. y Hirt, H. (2009) A major role of the MEKK1-MKK1/2-MPK4 pathway in ROS signalling. *Mol Plant* **2**: 120-137.
- Prentki, P. y Krisch, H.M. (1984) In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**: 303-313.
- Pueppke, S.G. y Broughton, W.J. (1999) *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol Plant-Microbe Interact* **12**: 293-318.
- Puppo, A., Pauly, N., Boscari, A., Mandon, K. y Brouquisse, R. (2013) Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the legume—*Rhizobium* and mycorrhizal symbioses. *Antioxid Redox Signal* **18**: 2202-2219.
- Puri, N., Jenner, C., Bennett, M., Stewart, R., Mansfield, J., Lyons, N. y Taylor, J. (1997) Expression of *avrPphB*, an avirulence gene from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, and the delivery of signals causing the hypersensitive reaction in bean. *Mol Plant-Microbe Interact* **10**: 247-256.

- Quezada, C.M., Hicks, S.W., Galan, J.E. y Stebbins, C.E. (2009) A family of *Salmonella* virulence factors functions as a distinct class of autoregulated E3 ubiquitin ligases. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 4864–4869.
- Qiu, Y., Xi, J., Du, L. y Poovaiah, B.W. (2012) The function of calreticulin in plant immunity: new discoveries for an old protein. *Plant signaling & behaviour* **7**: 907–910.
- Rabin, S.D., Veessenmeyer, J.L., Biegging, K.T. y Hauser, A.R.A. (2006) C-terminal domain targets the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU to the plasma membrane of host cells. *Infect Immun* **74**: 2552–2561.
- Radics, J., Königsmaier, L. y Marlovits, T.C. (2014) Structure of a pathogenic type 3 secretion system in action. *Nat Struct Mol Biol* **21**: 82–87.
- Rahme, L.G., Mindrinos, M.N., y Panopoulos, N.J. (1992) Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J Bacteriol* **174**: 3499–3507.
- Rego, A., Chandran, V. y Waksman, G. (2010) Two-step and one-step secretion mechanisms in Gram-negative bacteria: contrasting the type IV secretion system and the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Biochem J* **425**: 475–488.
- Resh, M.D. (2006) Palmitoylation of ligands, receptors, and intracellular signaling molecules. *Science Signaling* **2006**.
- Reyna, N.S. y Yang, Y. (2006) Molecular analysis of the rice MAP kinase gene family in relation to *Magnaporthe grisea* infection. *Mol Plant-Microbe Interact* **19**: 530–540.
- Rodrigues, J.A., López-Baena, F.J., Ollero, F.J., Vinardell, J.M., Espuny, M.R., Bellogín, R.A., Ruiz-Sainz, J.E., Thomas, J.R., Sumpton, D., Ault, J. y Thomas-Oates, J. (2007) NopM and NopD are rhizobial nodulation outer proteins: identification using LC-MALDI and LC-ESI with a monolithic capillary column. *J Proteome Res* **6**: 1029–1037.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M. y Jones, J.D. (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu Rev Phytopathol* **49**: 317–343.
- Robert-Seilaniantz, A., Shan, L., Zhou, J.M. y Tang, X. (2006) The *Pseudomonas syringae* pv. tomatoDC3000 type III effector HopF2 has a putative myristoylation site required for its avirulence and virulence functions. *Mol Plant-Microbe Interact* **19**: 130–138.

- Rohde, J.R., Breitschütz, A., Chenal, A., Sansonetti, P.J. y Parsot, C. (2007) Type III secretion effectors of the IpaH family are E3 ubiquitin ligases. *Cell Host Microbe* **1**: 77–83.
- Rojo, E., Solano, R. y Sanchez-Serrano, J.J. (2003) Interactions between signaling compounds involved in plant defense. *J Plant Growth Regul* **22**: 82–98.
- Rosas, S., Soria, R., Correa, N. y Abdala, G. (1998) Jasmonic acid stimulates the expression of nod genes in *Rhizobium*. *Plant Mol Biol* **38**: 1161–1168.
- 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.
- Rotino, G.L. y Gleddie, S. (1990) Transformation of eggplant (*Solanum melongena* L.) using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Plant Cell Reports* **9**: 26-29.
- Saad, M.M., Staehelin, C., Broughton, W.J. y Deakin, W.J. (2007) Protein-protein interactions within type three secretion system-dependent pili of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *J Bacteriol* **190**: 750-754.
- Saeki, K. (2011) Rhizobial measures to evade host defense strategies and endogenous threats to persistent symbiotic nitrogen fixation: a focus on two legume-rhizobium model systems. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68**: 1327-1339.
- Saiki, R.K. (1990) pp. 13-20. 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).
- Salomon, D y Sessa, G. (2010) Identification of growth inhibition phenotypes induced by expression of bacterial type III effectors in yeast. *J Vis Exp* **37**: 1865.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) En *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, Nueva York (EEUU).
- Sambrook J. y Russell D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, (EEUU).
- Santos, R., Hérouart, D., Sigaud, S., Touati, D. y Puppo, A. (2001) Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Mol Plant-Microbe Interact* **14**: 86-89.

- Sato, T., Fujikake, H., Ohtake, N., Sueyoshi, K., Takahashi, T., Sato, A. y Ohyama, T. (2002) Effect of exogenous salicylic acid supply on nodule formation of hypernodulating mutant and wild type of soybean. *Soil Sci Plant Nutr* **48**: 413–420.
- 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.
- Schechter, L.M., Guenther, J., Olcay, E.A., Jang, S.C. y Krishnan, H.B. (2010) Translocation of NopP by *Sinorhizobium fredii* USDA257 into *Vigna unguiculata* root nodules. *Appl Environ Microbiol* **76**: 3758-3761.
- Schikora, A., Virlogeux-Payant, I., Bueso, E., Garcia, A.V., Nilau, T., Charrier, A., y Pelletier, S., Menanteau, P., Baccarini, M., Velge, P. y Hirt, H. (2011) Conservation of *Salmonella* infection mechanisms in plants and animals. *PLoS One* **6**.
- Schmidt, J.S., Harper, J.E., Hoffman, T.K. y Bent, A.F. (1999) Regulation of soybean nodulation independent of ethylene signalling. *Plant Physiol* **119**: 951–959.
- Schulte, R., y Bonas, U. (1992) Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria hrp gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *J Bacteriol* **174**: 815-823.
- Selbach, M., Ernst Paul, F., Brandt, S., Guye, P., Daumke, O., Backert, S., Dehio, C. y Mann, M. (2009) Host cell interactome of tyrosine-phosphorylated bacterial proteins. *Cell Host Microbes* **5**: 397–403.
- Seo, H.S., Li, J., Lee, S., Yu, J., Kim, K., Lee, S.H., Lee, I.J. y Paek, N. (2007) The hypernodulating nts mutation induces jasmonate synthetic pathway in soybean leaves. *Molecules and cells* **24**: 185.
- Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J.E. y Innes, R.W. (2003) Cleavage of Arabidopsis PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* **301**: 1230–1233.
- Shao, F., Merrit, P.M., Bao, Z., Innes, R.W. y Dixon, J.E. (2002) A Yersinia effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* **109**: 575–588.
- Shan, L., He, P., Li, J., Heese, A., Peck, S.C., Nürnberger, T., Martin, G.B. y Sheen, J. (2008) Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host Microbe* **4**: 17–27.

- Shimoda, Y., Han, L., Yamazaki, T., Suzuki, R., Hayashi, M. y Imaizumi-Anraku, H. (2012) Rhizobial and fungal symbioses show different requirements for calmodulin binding to calcium calmodulin dependent protein kinase in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* **24**: 304-321.
- Siggers, K.A. y Lesser, C.F. (2008) The Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a versatile model system for the identification and characterization of bacterial virulence proteins. *Cell Host Microbe* **4**: 8–15.
- Silver, A., Kikuchi, Y., Fadl, A., Sha, J., Chopra, A. y Graf, J. (2007) Interaction between innate immune cells and a bacterial type III secretion system in mutualistic and pathogenic associations. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 9481–86.
- Simon, R. (1984) High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vitro constructed TnS-Mob transposon. *Mol Gen Genet* **196**: 413-420.
- Singer, A.U., Rohde, J.R., Lam, R., Skarina, T., Kagan, O., DiLeo, R., Chirgadze, N.Y., Cuff, M.E., Joachimiak, A., Tyers, M., Sansonetti, M.J., Parsot, C. y Savchenko, A. (2008) Structure of the *Shigella* T3SS effector IpaH defines a new class of E3 ubiquitin ligases. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 1293–1301.
- 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, D. y Johnson, K. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**: 31–40.
- Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debellé, F., Gough, C., Bisseling, T. y Geurts, R. (2005) NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* **308**: 1789-1791.
- Smeekens, S. y Hellmann, H.A. (2014) Sugar sensing and signaling in plants. *Frontiers in Plant Cell* **5**: 113.
- Smotrys, J.E. y Linder, M.E. (2004) Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function. *Annu Rev Biochem* **73**: 559–587.
- Sorkin, A. y von Zastrow, M. (2009) Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 609–622.

- Soto, M.J., Domínguez-Ferreras, A., Pérez-Mendoza, D., Sanjuán, J. y Olivares, J. (2009). Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant–bacteria interactions. *Cellular microbiology* **11**: 381-388.
- Soto, M.J., Nogales, J., Pérez-Mendoza, D., Gallegos, M.T., Olivares, J. y Sanjuán, J. (2011) Pathogenic and mutualistic plant-bacteria interactions: ever increasing similarities. *Central European Journal of Biology* **6**: 911-917.
- Soundararajan, V., Patel, N., Subramanian, V., Sasisekharan, V. y Sasisekharan, R. (2011) The many faces of the YopM effector from plague causative bacterium *Yersinia pestis* and its implications for host immune modulation. *Innate Immun* **17**: 548–557.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- Soyano, T., Hirakawa, H., Sato, S., Hayashi, M. y Kawaguchi, M. (2014) Nodule inception creates a long-distance negative feedback loop involved in homeostatic regulation of nodule organ production. *PNAS* **111**: 14607-14612.
- Spaink, H.P., Wijffelman, C.A., Pees, E., Okker, R.J.H. y Lugtenberg, B.J.J. (1987) *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature* **328**: 337-340.
- Spoel, S.H. y Dong, X. (2012) How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology* **12**: 89-100.
- Sprent, J.I. (2007) Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytol* **174**: 11–25.
- Stacey, G., McAlvin, C.B., Kim, S.Y., Olivares, J. y Soto, M.J. (2006) Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **141**: 1473-1481.
- Studier, F.W. y Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130.
- Subtil, A., Parsot, C. y Dautry-Varsat, A. (2001) Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. *Mol Microbiol* **39**: 792-800.
- Sugano, S., Jiang, C.J., Miyazawa, S.I., Masumoto, C., Yazawa, K., Hayashi, N., Shimono, M., Nakayama, A., Miyao, M. y Takatsuji, H. (2010) Role of OsNPR1 in

- rice defense program as revealed by genome-wide expression analysis. *Plant Mol Biol* **74**: 549–562.
- Sun, J., Cardoza, V., Mitchell, D.M., Bright, L., Oldroyd, G y Harris, J.M. (2006) Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *Plant J* **46**: 961-970.
- Suzaki, T. y Kawaguchi, M. (2014) Root nodulation: a developmental program involving cell fate conversion triggered by symbiotic bacterial infection. *Current Opinion in Plant Biology* **21**: 16–22.
- Suzuki, A., Suriyagoda, L., Shigeyama, T., Tominaga, A., Sasaki, M., Hiratsuka, Y., Yoshinaga, A., Arima, S., Agarie, S., Sakai, T., Inada, S., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Uchiumi, T., Abe, M., Hashiguchi, M., Akashi, R., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S. y Hirsch, A.M. (2011) *Lotus japonicus* nodulation is photomorphogenetically controlled by sensing the red/far red (R/FR) ratio through jasmonic acid (JA) signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 16837–16842.
- Tampakaki, A.P. (2014) Commonalities and differences of T3SSs in rhizobia and plant pathogenic bacteria. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Tampakaki, A.P., Bastaki, M., Mansfield, J.W. y Panopoulos, N.J. (2002) Molecular determinants required for the avirulence function of AvrPphB in bean and other plants. *Mol Plant-Microbe Interact* **15**: 292–300.
- Tazawa, J., Takahashi, M., Usuki, K. y Yamamoto, H. (2007) Nodulation during vegetative growth of soybean stage does not affect the susceptibility to red crown rot caused by *Calonectria ilicicola*. *J Gen Plant Pathol* **73**: 180-184.
- Thanassi, D.G. y Hultgren, S.J. (2000) Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 420-430.
- Thomma, B., Eggermont, K., Penninckx, I., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R. Cammue, B.P. y Broekaert, W.F. (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 15107–15111.
- Thomma, B.P., Eggermont, K., Tierens, K.F. y Broekaert, W.F. (1999) Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of Arabidopsis to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol* **121**: 1093–1102.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. y Pickart, C.M. (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Eur Mol Biol Organ J* **19**: 94–102.

- Tiana, D., Wang, J., Zeng, X., Gao, K., Qiu, C., Yang, X., Zhou, Z., Gao, M., Luo, Y., Murata-Hori, M., White F.F. y Yin, Z. (2014) The Rice TAL effector-dependent resistance protein XA10 triggers cell death and calcium depletion in the endoplasmic reticulum. *The Plant Cell* **26**: 497-515.
- Towler, D.A., Eubanks, S.R., Towery, D.S., Adams, S.P. y Glaser, L. (1987) Amino-terminal processing of proteins by N-myristoylation. Substrate specificity of N-myristoyl transferase. *J Biol Chem* **262**: 1030-1036.
- Troisfontaines, P. y Cornelis, G.R. (2005) Type III secretion: more systems than you think. *Physiology* **20**: 326-339.
- Tsukui, T., Eda, S., Kaneko, T., Sato, S., Okazaki, S., Kakizaki-Chiba, K., Itakura, M., Mitsui, H., Yamashita, A., Terasawa, K. y Minamisawa, K. (2013) The type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 mediates symbiotic incompatibility with Rj2 soybean plants. *Appl Environ Microbiol* **79**: 1048-1051.
- Tsurumaru, H., Kanasaki, Y., Hashimoto, S., Okizaki, K., Yoshikawa, H. y Yamakawa, T. (2014) Draft genome sequence of *Bradyrhizobium japonicum* Is-34, which is incompatible with Rj4 genotype soybeans. *Genome announcements* **2**.
- Underwood, W., Zhang, S. y He, S.Y. (2007) The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **52**: 658-672.
- Valdivia, R.H. (2004) Modeling the function of bacterial virulence factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **3**: 827-834.
- Van der Biezen, E.A. y Jones, J.D. (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* **23**: 454-456.
- Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M. y Pieterse, C.M.J. (2009) Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry* **70**: 1581-1588.
- Van der Hoorn, R.A. y Kamoun, S. (2008) From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen eVectors. *Plant Cell* **20**: 2009-2017.
- Van Loon, L.C. y Van Strien, E.A. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**: 85-97.

- Van Nhieu, G.T., BenZeev, A. y Sansonetti, P.J. (1997) Modulation of bacterial entry into epithelial cells by association between vinculin and the *Shigella* IpaA invasin. *Eur Mol Biol Organ J* **16**: 2717-2729.
- Van Wees, S.C.M., Van der Ent, S. y Pieterse, C.M.J. (2008) Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 443-448.
- Vasse, J., de Billy, F. y Truchet, G. (1993) Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accomplished by a hypersensitive reaction. *Plant J* **4**: 555-566.
- Vinardell, J.M., Acosta-Jurado, S., Zehner, S., Göttfert, M., Becker, A., Baena, I., Blom, J., Crespo-Rivas, J.C., Goesmann, A., Jaenicke, S., Krol, E., McIntosh, M., Margaret, I., Pérez-Montaña, F., Schneiker-Bekel, S., Serranía, J., Szczepanowski, R., Buendía, A.M., Lloret, J., Bonilla, I., Pühler, A., Ruiz-Sainz, J.E. y Weidner, S. (2015) The *Sinorhizobium fredii* HH103 genome: a comparative analysis with *S. fredii* strains differing in their symbiotic behaviour with soybean. *Mol Plant-Microbe Interact* *In press*.
- Vinardell, J.M., López-Baena, F.J., Hidalgo, A., Ollero, F.J., Bellogín, R.A., Espuny, M.R., Temprano, F., Romero, F., Krishnan, H.B., Pueppke, S.G. y Ruiz-Sainz, J.E. (2004) The effect of FITA mutations on the symbiotic properties of *S. fredii* varies in a chromosomal-background-dependent manner. *Arch Microbiol* **181**: 144-154.
- Vincent, J.M. (1970) En *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. Blackwell Scientific Publication, Oxford (Reino Unido).
- 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.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.A. y Klessig, D.F. (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* **47**: 177-206.
- Wagner, S., Konigsmair, L., Lara-Tejero, M., Lefebvre, M., Marlovits, T. y Galán J.E. (2010) Organization and coordinated assembly of the type III secretion export apparatus. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 17745-17750
- Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A.H. y Dong, X. (2007) Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr Biol* **17**: 1784-1790

- Wang, D., Weaver, N.D., Kesarwani, M. y Dong, X. (2005) Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science* **308**: 1036-1040.
- Wang, W., Barnaby, J.Y., Tada, Y., Li, H., Tör, M., Caldelari, D., Lee, D.U., Fu, X.D., Dong, X. (2011) Timing of plant immune responses by a central circadian regulator. *Nature* **470**: 110-114.
- Wang, Z. y Li, X. (2009) IAN/GIMAPs are conserved and novel regulators in vertebrates and angiosperm plants. *Plant Signaling & Behavior* **4**: 165-167.
- Wei, Z.M., Sneath, B.J. y Beer, S.V. (1992) Expression of Kora *hrp* genes in response to environmental stimuli. *J Bacteriol* **174**: 1875-1882.
- Wenzel, M., Friedrich, L., Göttfert, M. y Zehner, S. (2010) The type III-secreted protein NopE1 affects symbiosis and exhibits a calcium-dependent autocleavage activity. *Mol Plant-Microbe Interact* **23**: 124-129.
- Willems, A. (2006) The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil* **287**: 3-14.
- Wu, L.F., Ize, B., Chanal, A., Quentin, Y. y Fichant, G. (2000) Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: evolution and mechanism. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**: 179-189.
- Wu, S., Shan, L. y He, P. (2014) Microbial signature-triggered plant defense responses and early signaling mechanisms. *Plant Science* **228**: 118-126.
- Xiaolin, S.U.N., William, T.J. y Erik, H.A. (2012) GRAS proteins: the versatile roles of intrinsically disordered proteins in plant signalling. *Biochemical Journal* **442**: 1-12.
- Xiao, Y., Lu, Y., Heu, S. y Hutcheson, S.W. (1992) Organization and environmental regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrp* cluster. *J Bacteriol* **174**: 1734-1741.
- Xin, D.W., Liao, S., Xie, Z.P., Hann, D.R., Steinle, L., Boller, T. y Staehelin, C. (2012) Functional analysis of NopM, a novel E3 ubiquitin ligase (NEL) domain effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *PLoS pathogens*. **8**.
- Xu, P., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, J., Finley, D. y Peng, J. (2009) Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* **137**: 133-145.

- Yakushiji, S., Ishiga, Y., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. e Ichinose, Y. (2009) Bacterial DNA activates immunity in *Arabidopsis thaliana*. *J Gen Plant Pathol* **75**: 227–234.
- Yang, H., Yang, S., Li, Y. y Hua, J. (2007) The *Arabidopsis* BAP1 and BAP2 genes are general inhibitors of programmed cell death. *Plant Physiol* **145**: 135–146.
- Yang, S. y Hua, J. (2004) A haplotype-specific Resistance gene regulated by BONZAI1 mediates temperature-dependent growth control in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 1060–1071.
- 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.
- Zamioudis, C. y Pieterse, C.M. (2011) Modulation of Host Immunity by Beneficial Microbes. *Mol Plant-Microbe Interact* **25**: 139-150.
- Zehner, S., Schober, G., Wenzel, M., Lang, K. y Göttfert, M. (2008) Expression of the *Bradyrhizobium japonicum* type III secretion system in legume nodules and analysis of the associated *tts* box promoter. *Mol Plant-Microbe Interact* **21**: 1087-1093.
- Zhang, F.L. y Casey, P.J. (1996) Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* **65**: 241–269.
- Zhang, L., Chen, X.J., Lu, H.B., Xie, Z.P. y Staehelin, C. (2011) Functional analysis of the type 3 effector NopL from *Rhizobium* sp. NGR234: symbiotic effects, phosphorylation and interference with MAPK signaling. *J Biol Chem* **37**: 32178-32187.
- Zhang, S. y Klessig, D.F. (1998) The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 7225-7230.
- Zhang, S. y Klessing, D.F. (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in plant science* **6**: 520-527.
- Zhang, S., Liu, Y. y Klessig, D.F. (2000) Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitors. *The Plant Journal* **23**: 339-347.
- Zhou, H., Lin, L., Johnson, A., Morgan, R.L., Zhong, W. y Ma, W. (2011) *Pseudomonas syringae* type III effector HopZ1 targets a host enzyme to suppress isoflavone biosynthesis and promote infection in soybean. *Cell Host Microbe* **9**: 177–186.

- Zhou, H., Morgan, R.L., Guttman, D.S. y Ma, W. (2009) Allelic variants of the *Pseudomonas syringae* type III effector HopZ1 are differentially recognized by plant resistance systems. *Mol Plant-Microbe Interact* **22**: 176–189.
- Zhu, Y., Li, H., Hu, L., Wang, J., Zhou, Y., Wang, J., Zhou, Y., Pang, Z., Liu, L. y Shao, F. (2008) Structure of a *Shigella* effector reveals a new class of ubiquitin ligases. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 1302–1308.
- Zipfel, C. (2014) Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology* **35**: 345-351.

Anexos

Anexo 1: Proteínas resultantes de la búsqueda en la base de datos con Mascot usando los datos obtenidos con LC-MALDI-MS/MS a partir de la banda recortada del ensayo de fosforilación en gel de NopL.

Rank	Protein Score	Protein Score C.I. %	Protein Name / Specie	Protein MW	Protein PI	Ascension number	Pep. count	Total Ion Score	Total Ion Score
1	129	100	Linoleate 9S-lipoxygenase-4 OS=Glycine max GN=LOX1.5 PE=1 SV=1	96645.6	5.71	sp P38417 LOX4_	9	99	100
2	118	100	Lipoxygenase OS=Glycine max GN=lox7 PE=2 SV=1	96516.6	5.99	tr Q42780 Q4278	7	99	100
3	116	100	Linoleate 9S-lipoxygenase (Fragment) OS=Phaseolus vulgaris PE=2 SV=1	84258.4	6.14	sp P27481 LOXB_	6	99	100
4	115	100	Lipoxygenase OS=Glycine max PE=3 SV=1	91336.9	6.08	tr B3TDK8 B3TDK	6	99	100
5	114	100	Lipoxygenase OS=Glycine max PE=3 SV=1	96430.8	6.34	tr B3TDK9 B3TDK	6	99	100
6	114	100	Lipoxygenase OS=Glycine max PE=3 SV=1	96751.7	5.78	tr I1MD22 I1MD2	6	99	100
7	111	100	Lipoxygenase OS=Glycine max PE=3 SV=1	90817.6	6.23	tr I1MD20 I1MD2	5	99	100
8	110	100	Lipoxygenase OS=Glycine max GN=vixB PE=1 SV=1	96768.6	5.63	tr Q43446 Q4344	5	99	100
9	108	100	Lipoxygenase (Fragment) OS=Phaseolus vulgaris GN=LOX4 PE=2 SV=1	96276.6	5.96	tr Q9M684 Q9M68	5	98	100
10	106	100	Lipoxygenase OS=Phaseolus vulgaris PE=3 SV=1	97706.2	5.94	tr Q9FQF9 Q9FQF	4	98	100
11	79	99.921	Uncharacterized protein OS=Setaria italica GN=S028376m.g PE=4 SV=1	136984.2	7.95	tr K3ZP46 K3ZP4	18		
12	74	99.755	Seed linoleate 9S-lipoxygenase-3 OS=Glycine max GN=LOX1.3 PE=1 SV=1	97096.9	6.26	sp P09186 LOX3_	8	50	99.857
13	74	99.712	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Glycine max PE=4 SV=1	24768.5	4.96	tr K7L9E5 K7L9E	4	49	99.835
14	67	98.588	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Glycine max PE=4 SV=1	21093.9	5.4	tr K7M7M2 K7M7M	3	49	99.835
15	67	98.556	Lipoxygenase (Fragment) OS=Glycine max PE=2 SV=1	70849.7	8.86	tr Q39874 Q3987	6	50	99.857
16	66	98.452	Lipoxygenase OS=Medicago truncatula GN=MTR_2g099560 PE=3 SV=1	97081.9	5.87	tr G7IS29 G7IS2	7	49	99.822
17	66	98.452	Lipoxygenase (Fragment) OS=Arachis diogol PE=2 SV=1	22348.7	8.05	tr C6ZGE3 C6ZGE	3	50	99.857
18	65	97.814	Lipoxygenase OS=Glycine max GN=Lx3 PE=3 SV=1	97106.8	6.12	tr B3TDK6 B3TDK	6	50	99.857
19	64	97.49	Lipoxygenase OS=Glycine max PE=3 SV=1	92963.9	6.52	tr I1M599 I1M59	6	50	99.857
20	62	95.737	Lipoxygenase OS=Arachis hypogaea GN=Pnlox2 PE=2 SV=1	97819.8	5.37	tr Q4JME7 Q4JME	6	50	99.857
21	61	95.106	WGS project CAID00000000 data, contig chromosome 10 OS=Ostreococcus tauri GN=Ot10g01350 PE=4 SV=1	33837.4	6.49	tr Q010E0 Q010E	9		
22	61	94.25	Uncharacterized protein OS=Glycine max PE=2 SV=1	21165.3	6.75	tr C6SWC0 C6SWC	9		
23	60	92.592	Putative uncharacterized protein OS=Volvox carteri GN=VOLCADRAFT_77867 PE=3 SV=1	65035.6	8.96	tr D8UHU9 D8UHU	11		
24	59	91.878	Uncharacterized protein OS=Glycine max PE=4 SV=1	18295.5	6.75	tr K7MGJ6 K7MGJ	2	49	99.835
25	59	90.887	Lipoxygenase (Fragment) OS=Glycine max GN=lox8 PE=2 SV=1	4896.5	6.34	tr Q42781 Q4278	1	49	99.835
26	57	87.127	Uncharacterized protein OS=Brachypodium distachyon GN=BRADI2G46670 PE=4 SV=1	238143	6.74	tr I1HQF1 I1HQF	20		
27	56	84.523	Lipoxygenase OS=Glycine max PE=3 SV=2	97250.1	6.93	tr I1KUQ6 I1KUQ	4	49	99.835
28	56	83.794	Lipoxygenase OS=Medicago truncatula GN=MTR_2g099570 PE=3 SV=1	97666.9	6.08	tr G7IS30 G7IS3	3	50	99.857
29	56	83.794	Lipoxygenase OS=Pisum sativum GN=LoxG PE=2 SV=1	97281.1	6.32	tr Q43817 Q4381	4	49	99.835
30	56	82.23	Lipoxygenase OS=Arachis hypogaea GN=Pnlox3 PE=2 SV=1	97699.9	5.33	tr Q4JME6 Q4JME	4	50	99.857
31	56	81.393	Lipoxygenase OS=Medicago truncatula GN=MTR_8g018690 PE=3 SV=1	96742.8	6.21	tr G7LIZ2 G7LIZ	3	49	99.835
32	56	80.959	Seed linoleate 9S-lipoxygenase-2 OS=Glycine max GN=LOX1.2 PE=2 SV=1	97370.1	6.27	sp P09439 LOX2_	3	50	99.857
33	55	79.598	Lipoxygenase OS=Glycine max PE=3 SV=1	97082.1	6.7	tr I1KUQ0 I1KUQ	3	50	99.857
34	55	78.636	Seed linoleate 9S-lipoxygenase-2 OS=Pisum sativum GN=LOX1.2 PE=2 SV=1	97414.9	6.08	sp P14856 LOX2_	4	49	99.822
35	55	77.108	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Glycine max PE=4 SV=1	15168.9	5.01	tr K7M7C2 K7M7C	1	50	99.857
36	55	77.108	Serine-threonine protein kinase, plant-type, putative OS=Ricinus communis GN=RCOM_1029720 PE=4 SV=1	24251.6	6.32	tr B9SK97 B9SK9	7		
37	54	76.029	Predicted protein OS=Populus trichocarpa GN=POPTRDRAFT_818220 PE=4 SV=1	311293.9	7.51	tr B9H1M0 B9H1M	23		
38	54	76.029	General secretion pathway protein K, putative (Fragment) OS=Ricinus communis GN=RCOM_1918590 PE=4 SV=1	24964.8	4.58	tr B9TK73 B9TK7	7		
39	53	69.12	Uncharacterized protein OS=Oryza glaberrima PE=4 SV=1	104359.1	8.88	tr I1Q8M7 I1Q8M	13		
40	53	69.12	Uncharacterized protein OS=Oryza glaberrima PE=3 SV=1	34036.1	6.23	tr I1Q8K2 I1Q8K	6	18	0
34	55	78.636	Seed linoleate 9S-lipoxygenase-2 OS=Pisum sativum GN=LOX1.2 PE=2 SV=1	97414.9	6.08	sp P14856 LOX2_	4	49	99.822
35	55	77.108	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Glycine max PE=4 SV=1	15168.9	5.01	tr K7M7C2 K7M7C	1	50	99.857
36	55	77.108	Serine-threonine protein kinase, plant-type, putative OS=Ricinus communis GN=RCOM_1029720 PE=4 SV=1	24251.6	6.32	tr B9SK97 B9SK9	7		
37	54	76.029	Predicted protein OS=Populus trichocarpa GN=POPTRDRAFT_818220 PE=4 SV=1	311293.9	7.51	tr B9H1M0 B9H1M	23		
38	54	76.029	General secretion pathway protein K, putative (Fragment) OS=Ricinus communis GN=RCOM_1918590 PE=4 SV=1	24964.8	4.58	tr B9TK73 B9TK7	7		
39	53	69.12	Uncharacterized protein OS=Oryza glaberrima PE=4 SV=1	104359.1	8.88	tr I1Q8M7 I1Q8M	13		
40	53	69.12	Uncharacterized protein OS=Oryza glaberrima PE=3 SV=1	34036.1	6.23	tr I1Q8K2 I1Q8K	6	18	0

Rank	Protein Score	Protein Score C.I. %	Protein Name / Specie	Protein MW	Protein PI	Ascension number	Pep. count	Total Ion Score	Total Ion Score
41	53	62.874	Uncharacterized protein OS=Glycine max PE=4 SV=1	59157.2	8.67	tr I1KRX7 I1KRX	9		
42			Uncharacterized protein OS=Oryza glaberrima PE=4 SV=1	48244.5	6.47	tr I1QST7 I1QST	1	38	97.612
43			Uncharacterized protein (Fragment) OS=Setaria italica GN=Si028050m.g PE=4 SV=1	8680.9	4.29	tr K3ZN75 K3ZN7	1	37	97.314
44			Uncharacterized protein OS=Setaria italica GN=Si034712m.g PE=4 SV=1	68429.1	5.5	tr K4A756 K4A75	1	31	87.808
45			HSP90-1 OS=Glycine max PE=2 SV=1	80615	4.94	tr D6C4Z9 D6C4Z	1	25	57.726
46			R2r3-myb transcription factor, putative OS=Ricinus communis GN=RCOM_0652920 PE=4 SV=1	12412.5	9.89	tr B9S5R4 B9S5R	1	25	53.648
47			Putative uncharacterized protein (Fragment) OS=Chlorella variabilis GN=CHLNCRAFT_6949 PE=4 SV=1	69485.8	6	tr E1Z5I5 E1Z5I	1	24	36.163
48			Putative uncharacterized protein Sb0011s003440 (Fragment) OS=Sorghum bicolor GN=Sb0011s003440 PE=4 SV=1	56181.2	8.55	tr C6JRM5 C6JRM	1	23	33.308
49			Uncharacterized protein OS=Brachypodium distachyon GN=BRADI4G16280 PE=4 SV=1	69730.2	6.73	tr I1L27 I1L2	1	23	32.478
50			Predicted protein OS=Populus trichocarpa GN=POPTRDRAFT_549854 PE=4 SV=1	77075.6	6.16	tr B9GGC1 B9GGC	1	23	28.703

Los parámetros que indican la fiabilidad de los resultados son el “Total Ion Score C.I. %” y el “Protein Score C.I. %”. El primero es el intervalo de confianza para el “Total ion score”, es decir, cómo de creíble es el dato. Por encima de un 99% el resultado se considera creíble. El “Protein Score C.I. %” es el intervalo de confianza para el “Protein Score” y para considerar que un resultado es significativo este valor debe estar por encima del 95%.

Anexo 2: Proteínas resultantes de la búsqueda en la base de datos con Mascot usando los datos obtenidos con LC-MALDI-MS/MS a partir de la banda de ~ 75 kDa (superior) y de ~ 68 kDa (inferior) recortadas del ensayo de fosforilación en gel de NopP.

Rank	Protein Score	Protein Score C.I. %	Protein Name / Specie	Protein MW	Protein PI	Ascension number	Pep. count	Total Ion Score	Total Ion Score
1	843	100	Methionine synthase OS=Glycine max PE=2 SV=1	84400.7	5.93	tr Q71EW8 Q71EW	23	665	100
2	702	100	Uncharacterized protein OS=Glycine max PE=4 SV=1	78217.3	6.26	tr I1MKZ0 I1MKZ	20	553	100
3	383	100	Uncharacterized protein OS=Glycine max PE=3 SV=2	84818.7	5.91	tr I1MW49 I1MW4	18	270	100
4	357	100	Methionine synthase (Fragment) OS=Medicago sativa PE=2 SV=1	20919.7	5.21	tr Q68YN5 Q68YN	9	275	100
5	348	100	Methionine synthase OS=Solanum tuberosum PE=2 SV=1	84897.8	5.93	tr Q9LM03 Q9LM0	14	270	100
6	339	100	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase OS=Solenostemon scutellaroides GN=MET PE=1 SV=2	84821.9	6.09	sp Q42662 METE_	13	271	100
7	326	100	Methionine synthase OS=Orobancha ramosa GN=met1 PE=2 SV=1	84861.8	6.02	tr B2VQE0 B2VQE	12	270	100
8	321	100	Vitamin-b12 independent methionine synthase, 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine OS=Populus trichocarpa GN=MS1 PE=3 SV=1	84943.6	6.26	tr B9MYM2 B9MYM	11	271	100
9	313	100	Vitamin-b12 independent methionine synthase, 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine OS=Populus trichocarpa GN=MS2 PE=3 SV=1	85032.6	6.17	tr B9HQI3 B9HQI	10	271	100
10	307	100	Putative uncharacterized protein OS=Vitis vinifera GN=VITISV_018473 PE=3 SV=1	81926.9	6.19	tr A5C7K7 A5C7K	9	271	100

Rank	Protein Score	Protein Score C.I. %	Protein Name / Specie	Protein MW	Protein PI	Ascension number	Pep. count	Total Ion Score	Total Ion Score
1	119	100	Malate dehydrogenase OS=Glycine max PE=3 SV=1	32969	7	tr I1JB84 I1JB8	5	92	100
2	118	100	Malate dehydrogenase OS=Glycine max PE=2 SV=1	35846.5	6.32	tr Q6RIB6 Q6RIB	5	92	100
3	111	100	Uncharacterized protein OS=Glycine max PE=3 SV=1	35546.5	5.29	tr I1M561 I1M56	9	47	99.706
4	107	100	Malate dehydrogenase OS=Glycine max PE=3 SV=1	26669.6	6.52	tr I1L7H7 I1L7H	3	92	100
5	79	99.919	Uncharacterized protein OS=Glycine max PE=4 SV=1	21112.7	6.09	tr I1M2F5 I1M2F	3	62	99.989
6	79	99.913	Uncharacterized protein OS=Glycine max PE=2 SV=1	21653	6.43	tr C6T2H1 C6T2H	3	62	99.989
7	79	99.911	Uncharacterized protein OS=Glycine max PE=4 SV=1	61059.1	5.51	tr I1L6W0 I1L6W	7	52	99.888
8	78	99.89	Uncharacterized protein OS=Lotus japonicus PE=2 SV=1	21766	6.21	tr I3T6Q9 I3T6Q	3	62	99.989
9	72	99.543	Uncharacterized protein OS=Glycine max PE=4 SV=1	18213.1	5.89	tr I1KQS0 I1KQS	2	62	99.989
10	72	99.543	Quinone reductase 2 OS=Triticum monococcum PE=2 SV=1	21735.9	5.95	tr Q5E163 Q5E16	2	62	99.989

