

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos
Estación Experimental del Zaidín, CSIC-Granada**



TESIS DOCTORAL

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES DE
OSMOADAPTACIÓN EN *Rhizobium* Y DE SU PAPEL EN
SIMBIOSIS CON LEGUMINOSAS**

ANA DOMÍNGUEZ FERRERAS

Granada, 2007

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos
Estación Experimental del Zaidín, CSIC-Granada**

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES DE OSMOADAPTACIÓN EN *Rhizobium* Y DE SU PAPEL EN SIMBIOSIS CON LEGUMINOSAS

**Memoria de Tesis Doctoral presentada por la licenciada en Ciencias Biológicas
Ana Domínguez Ferreras para aspirar al Grado de Doctor**

Fdo. Ana Domínguez Ferreras

VºBº Los Directores del trabajo

**Fdo. Dr. Juan Sanjuán Pinilla
Doctor en Ciencias Biológicas
Investigador Científico del CSIC**

**Fdo. Dra. María José Soto Misffut
Doctora en Ciencias Biológicas
Científico Titular del CSIC**

Granada, 2007

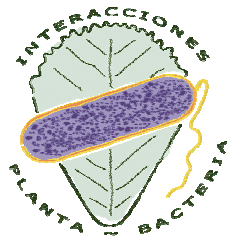
El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín de Granada (Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos y reuniones científicas:

- XIth International Symposium on Microbial Ecology. (Viena, 2006).
- VIIth European Nitrogen Fixation Conference. (Aarhus, 2006).
- XI Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno” (El Escorial, 2006).
- I Encuentro sobre Genómica y Nuevas Tecnologías para el Estudio del Sistema Modelo de Interacción entre Plantas y Microorganismos: *Sinorhizobium meliloti-Medicago truncatula*. (Granada, 2004).
- I Reunión Científica de la Red nacional de Genómica Bacteriana. (Granada, 2004).
- XXII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. (Miguel Pereira, 2004).
- X Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno. (Granada, 2004).

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han dado lugar a la siguiente publicación:

- **Domínguez-Ferreras, A.,** Pérez-Arnedo, R., Becker, A., Olivares, J., Soto, M. J. y Sanjuán, J., 2006. “Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid pSymB for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*”. *J. Bacteriol.* **188:** 7617-7625.



Espero saber aprovechar la oportunidad que se me brinda en este espacio para demostrar mi más profundo agradecimiento.

A mis directores de tesis, los doctores Juan Sanjuán y María José Soto, por haber guiado mis pasos por este largo camino. Quiero agradecerle a Juan su paciencia, la libertad que me ha proporcionado, incluso para aprender equivocándome, sus ánimos en los momentos bajos y el haber buscado siempre un rato para mí cuando lo he necesitado. A María José le agradezco todo el tiempo que ha dedicado a enseñarme, sus muchos consejos, el haberme señalado siempre la dirección correcta y haber sido para mí un modelo de dedicación y perseverancia.

Al doctor José Olivares por haberme permitido integrarme en su grupo de investigación y por la atención que me ha dedicado a lo largo de estos años.

A la doctora Anke Becker del Dpto. de Genética de la Universidad de Bielefeld por los meses pasados allí. Quisiera hacer este agradecimiento extensivo a todo su grupo por la ayuda que me prestaron y recordar particularmente a Liza, Natasha y Héctor por hacerme sentir como en casa.

A mis compañeros del laboratorio porque todos ellos me han ayudado y me han enseñado. A los que estuvieron poco tiempo, los que ya se fueron, los que volvieron y los que acaban de llegar, gracias por vuestra compañía y apoyo.

Querría agradecer especialmente a Soco todos los años que llevamos trabajando juntas, porque muchos de los experimentos de esta tesis hubieran sido imposibles sin su ayuda y porque nunca ha escatimado esfuerzos ni tiempo para echarme una mano.

Al Ministerio de Educación y Ciencia y al Consejo Superior de Investigaciones Científicas por la concesión de las becas que han hecho posible esta tesis.

Agradecimientos

Finalmente quisiera dedicar unas líneas a recordar también a la gente que a lo largo de todos estos años ha compartido conmigo su tiempo, sus preocupaciones, su experiencia y muchos buenos momentos.

A Quina y María por una amistad sincera que ha durado ya mucho tiempo y que nunca me ha fallado. A Mari Carmen por ser mi confidente y amiga cuando más lo necesitaba. A Nieves, Fran, José Carlos, Juande, Raúl, Mamen y Beatriz por todas las ocasiones en que me han demostrado su cariño. Y a todos los que me han acompañado en este duro viaje y han hecho un poco más agradable el trayecto.

A mis padres y a mi hermana por apoyarme siempre y ayudarme en todo.

A mis padres y a mi hermana

La naturaleza,
según las condiciones de que disponga,
y en tanto que sea posible,
siempre hace las cosas más bellas y mejores.

Aristóteles (384-322 a.C.)

Abreviaturas y Símbolos

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ap	Ampicilina
ARA	Actividad reductora de acetileno
ARN	Ácido ribonucleico
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
atm.	Atmósferas
ATP	Adenosín trifosfato
bv.	Biovariedad
°C	Grados centígrados
CDP	Citidín difosfato
cm	Centímetros
<i>et al.</i>	Y colaboradores
dATP	Desoxiadenosin trifosfato
dCTP	Desoxicitidin trifosfato
dGTP	Desoxiguanidin trifosfato
DMSO	Dimetilsulfósido
DMSP	Dimetil sulfonil propionato
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
dTTP	Desoxitimidin trifosfato
D.O.	Densidad óptica medida a la longitud de onda indicada
DTT	Ditiotreitol
dUTP	Desoxiuridin trifosfato
dUTP-aa	Desoxiuridin trifosfato amino modificado
eds.	Editores
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPS	Exopolisacárido
Fig.	Figura
g	Gramos

Gluc	Glucosa
Gm	Gentamicina
h	Horas
K ⁺	Iones potasio
Kb	Kilobases
K _m	Constante de Michaelis-Menten
Km	Kanamicina
KPS	Polisacáridos capsulares
L	Litros
LPS	Lipopolisacáridos
M	Molar
MES	Ácido morfolinoetanosulfónico
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MM	Medio mínimo
MOTS	Maltooligosil trehalosa sintasa
MOTTH	Maltooligosil trehalosa trehalohidrolasa
N ₂	Nitrógeno molecular
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamida adenin dinucleótido
NAGGN	N-acetil glutaminil glutamina amida
ng	Nanogramos
nm	Nanometros
nmol	Nanomoles
ORF	Marco de lectura abierta
pb	Pares de bases
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

pmol	Picomoles
PNPG	p-nitrofenil- β -D-glucurónido
pp.	Páginas
prot	Proteína
PSPA	Peso seco de la parte aérea
pSym	Plásmido simbiótico
r.p.m.	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SDS	Dodecil sulfato sódico
Sm	Streptomycin
sp.	Especie
Spc	Spectinomycin
Tc	Tetracycline
Tm	Toneladas métricas
Tp	Trimetropin
TPP	Trehalose-6-phosphate phosphatase
TPS	Trehalose-6-phosphate synthase
Treh	Trehalose
TS	Trehalose synthase
UDP	Uridine diphosphate
ufc	Unidades formadoras de colonias
Und-PP	Undecaprenyl pyrophosphate
V	Voltios
V _{max}	Velocidad máxima
X-Gluc	Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucurónido
μ g	Microgramos
μ l	Microlitros
μ M	Micromolar
μ m	Micrometros

Índices

	Página
INTRODUCCIÓN	1
I Osmoadaptación en bacterias	3
1 Estrategias de osmoadaptación	3
1.1 Acumulación de “Sal en el citoplasma”	5
1.2 Acumulación de solutos compatibles	6
2 Solutos compatibles	6
2.1 Funciones de los solutos compatibles	7
3 Respuesta a un choque hiperosmótico	9
3.1 Captación de potasio	10
3.1.1 Sistema Kdp	11
3.1.2 Regulación de la captación de potasio por el sistema Kdp	12
3.1.3 Sistema Trk	14
3.1.4 Sistema Kup	16
3.1.5 Otros sistemas de captación de potasio	17
3.1.6 Recuperación del equilibrio iónico	17
3.2 Acumulación de solutos compatibles	18
3.3 Acumulación de glicina betaína	20
3.3.1 Síntesis de glicina betaína	21
3.3.2 Transporte de glicina betaína	22
3.4 Acumulación de prolina	23
3.4.1 Transporte de prolina	24
3.5 Acumulación de trehalosa	24
3.5.1 Síntesis de trehalosa	26
3.5.2 Utilización de la trehalosa	30
3.6 Cambios en las envolturas celulares	31
II Simbiosis <i>Rhizobium</i>-Leguminosa	32
1 Simbiosis <i>Rhizobium</i>-Leguminosa	34
2 Proceso de nodulación	35
III Salinidad y fijación simbiótica de nitrógeno	38
1 Osmoadaptación en rizobios	42
1.1 Acumulación de potasio y glutamato	42
1.2 Osmoprotectores	43
1.3 Osmoprotectores no acumulados	44
1.3.1 La ectoína como osmoprotector no acumulado	44
1.3.2 Los disacáridos como osmoprotectores no acumulados	45
1.4 Acumulación de betaínas	46
1.4.1 Síntesis de glicina betaína	46
1.4.2 Transporte de colina	47
1.4.3 Transporte de betaínas	48
1.5 Acumulación de trehalosa	50
1.5.1 Síntesis de trehalosa	51

	Página
1.5.2 Transporte y utilización de trehalosa -----	52
1.5.3 Acumulación de trehalosa en el nódulo -----	53
1.6 Cambios en las envueltas celulares -----	54
OBJETIVOS -----	55
MATERIAL Y MÉTODOS -----	59
1 Cepas bacterianas y plásmidos -----	61
2 Medios de cultivo y conservación de cepas bacterianas -----	65
2.1 Medios de cultivo para <i>E. coli</i> -----	65
2.2 Medios de cultivo para <i>Rhizobium</i> -----	65
2.3 Conservación de cepas bacterianas -----	67
2.4 Antibióticos -----	67
3 Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos -----	67
3.1 Preparación de ADN plasmídico -----	67
3.1.1 Preparación de ADN plasmídico mediante lisis alcalina -----	67
3.1.2 QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen) -----	69
3.2 Preparación de ADN genómico -----	69
3.2.1 AquaPure Genomic DNA Isolation Kit (Bio-Rad) -----	70
3.3 Aislamiento de ARN total de <i>S. meliloti</i> -----	71
3.4 Purificación de muestras de ARN total de <i>S. meliloti</i> -----	72
4 Determinación de la concentración de ADN y ARN -----	72
5 Manipulación del ADN -----	73
5.1 Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción -----	73
5.2 Separación e identificación de fragmentos de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa -----	73
5.2.1 Electroforesis de ADN -----	73
5.2.2 Revelado de geles y fotografía -----	74
5.2.3 Estimación del tamaño de los fragmentos de restricción -----	74
5.3 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa: electroelución -----	74
5.4 Ligación de fragmentos de restricción con vectores de clonación -----	75
5.4.1 Ligación en vectores de clonación -----	75
5.4.2 Generación de extremos romos a partir de extremos protuberantes en 5' -----	76
5.4.3 Generación de extremos romos a partir de extremos protuberantes en 3' -----	76
5.5 Secuenciación y análisis informático -----	76
5.5.1 Secuenciación automática -----	76
5.5.2 Análisis informático de secuencias de ADN -----	77
6 Experimentos de hibridación ADN-ADN -----	77
6.1 Transferencia de ADN a filtros de nylon -----	77
6.2 Marcaje de sondas de ADN -----	78

	Página
6.3 Hibridación ADN-ADN con sonda no radiactiva -----	78
7 Transformación de células competentes -----	79
7.1 Obtención de células competentes de <i>E. coli</i> -----	79
7.2 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> -----	80
8 Transferencia de ADN entre cepas bacterianas -----	80
8.1 Conjugaciones simples -----	80
8.2 Conjugaciones triparentales -----	81
8.3 Transducción -----	81
9 Amplificación de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) --	82
10 Determinación de la actividad β -glucuronidasa -----	83
11 Determinación de la concentración de trehalosa -----	84
12 Experimentos de microarrays -----	85
12.1 Reversotranscripción del ARN -----	85
12.2 Hidrólisis del ARN -----	86
12.3 Marcaje del ADNc -----	86
12.4 Procesamiento del microarray previo a la hibridación -----	87
12.5 Hibridación de los Sm6kOligo microarrays usando un cubreobjetos y una cámara de hibridación -----	88
12.6 Hibridación de los Sm6kOligo microarrays usando una estación de hibridación automática -----	88
12.7 Procesamiento del microarray tras la hibridación -----	89
12.8 Adquisición de la imagen y tratamiento de datos -----	89
13 Ensayos con plantas -----	90
13.1 Esterilización de semillas y germinación -----	90
13.2 Solución nutritiva para el cultivo de plantas -----	90
13.3 Cultivo axénico de plantas -----	91
13.3.1 Cultivo axénico en tubos -----	91
13.3.2 Cultivo en jarras Leonard -----	92
13.3.3 Medida del grado de infectividad -----	92
13.3.4 Determinación de la actividad reductora de acetileno (A.R.A.) -----	92
13.3.5 Determinación de la competitividad -----	93
RESULTADOS Y DISCUSIÓN: CAPÍTULO 1 -----	95
1 Análisis de los cambios en el transcriptoma de <i>Sinorhizobium meliloti</i> en respuesta a un choque osmótico -----	97
1.1 Metabolismo energético y carbonado -----	102
1.2 Metabolismo proteico -----	103
1.3 Replicación y envueltas celulares -----	105
1.4 Metabolismo en estrés -----	108
1.5 Perfiles transcripcionales y agrupamientos génicos -----	110
RESULTADOS: CAPÍTULO 2 -----	115

	Página
2 Caracterización genética de sistemas de transporte de potasio en <i>Sinorhizobium meliloti</i> y <i>Mesorhizobium loti</i> -----	117
2.1 Caracterización de genes implicados en el transporte de potasio en <i>S. meliloti</i> y <i>M. loti</i> -----	118
2.2 Optimización de las condiciones de estrés a utilizar -----	125
2.3 Capacidad de osmoadaptación en vida libre de mutantes en sistemas de transporte de potasio de <i>S. meliloti</i> -----	127
2.3.1 Crecimiento de los mutantes de <i>S. meliloti</i> 1021 en medio líquido -----	127
2.3.2 Crecimiento de los mutantes de <i>S. meliloti</i> 1021 en medio sólido -----	135
2.4 Comportamiento simbiótico de los mutantes de <i>S. meliloti</i> 1021 -----	143
2.4.1 Infectividad de los mutantes en sistemas de transporte de potasio ----	144
2.4.2 Eficiencia simbiótica de los mutantes 10K1K y 10tAG -----	146
2.5 Capacidad de osmoadaptación en vida libre de mutantes en sistemas de transporte de potasio de <i>M. loti</i> -----	148
2.5.1 Crecimiento de los mutantes de <i>M. loti</i> MAFF303099 en medio líquido --	148
2.5.2 Crecimiento de los mutantes de <i>M. loti</i> MAFF303099 en medio sólido ---	151
2.6 Comportamiento simbiótico de los mutantes de <i>M. loti</i> MAFF303099 -----	154
DISCUSIÓN: CAPÍTULO 2 -----	157
ANEXOS: CAPÍTULO 2 -----	165
Anexo 2.1 Construcción de mutantes en sistemas de transporte de potasio de <i>S. meliloti</i> 1021 -----	167
Anexo 2.1.1 Construcción de un mutante en el gen <i>trkA</i> de <i>S. meliloti</i> 1021 ----	167
Anexo 2.1.2 Construcción de un mutante en el operón <i>kdp</i> de <i>S. meliloti</i> 1021--	169
Anexo 2.1.3 Construcción de un mutante en el gen <i>kup1</i> de <i>S. meliloti</i> 1021----	171
Anexo 2.1.4 Construcción de un mutante en el gen <i>kup2</i> de <i>S. meliloti</i> 1021----	173
Anexo 2.1.5 Construcción de los mutantes dobles y triples en sistemas de transporte de potasio de <i>S. meliloti</i> 1021 -----	175
Anexo 2.2 Construcción de mutantes en sistemas de transporte de potasio de <i>M. loti</i> MAFF303099 -----	177
Anexo 2.2.1 Construcción de un mutante en el operón <i>kdp</i> de <i>M. loti</i> MAFF303099 -----	177
Anexo 2.2.2 Construcción de un mutante en el gen <i>kup2</i> de <i>M. loti</i> MAFF303099 -----	179
RESULTADOS: CAPÍTULO 3 -----	181
3 Caracterización genética de sistemas de síntesis de trehalosa en <i>Sinorhizobium meliloti</i> y <i>Mesorhizobium loti</i> -----	183
3.1 Caracterización de genes implicados en la síntesis de trehalosa en <i>S. meliloti</i> y <i>M. loti</i> -----	184
3.2 Capacidad de osmoadaptación en vida libre de mutantes en rutas de síntesis de trehalosa de <i>S. meliloti</i> -----	190

	Página
3.2.1 Crecimiento de los mutantes de <i>S. meliloti</i> 1021 en medio líquido -----	190
3.2.2 Crecimiento de los mutantes de <i>S. meliloti</i> 1021 en medio sólido -----	199
3.3 Perfil de expresión de los genes <i>otsA</i> y <i>treY</i> de <i>S. meliloti</i> 1021 -----	204
3.4 Acumulación de trehalosa en los mutantes de <i>S. meliloti</i> 1021 -----	210
3.5 Comportamiento simbiótico de los mutantes de <i>S. meliloti</i> 1021 -----	214
3.5.1 Infectividad de los mutantes en sistemas de síntesis de trehalosa -----	214
3.5.2 Competitividad de los mutantes en sistemas de síntesis de trehalosa --	216
3.5.3 Eficiencia simbiótica del triple mutante 10SYOt -----	217
3.6 Capacidad de osmoadaptación en vida libre de mutantes en sistemas de síntesis de trehalosa de <i>M. loti</i> -----	220
3.6.1 Crecimiento de los mutantes de <i>M. loti</i> MAFF303099 en medio líquido---	220
3.6.2 Crecimiento de los mutantes de <i>M. loti</i> MAFF303099 en medio sólido---	222
3.7 Acumulación de trehalosa en los mutantes de <i>M. loti</i> MAFF303099 -----	225
3.8 Comportamiento simbiótico de los mutantes de <i>M. loti</i> MAFF303099 -----	226
DISCUSIÓN: CAPÍTULO 3 -----	229
ANEXOS: CAPÍTULO 3 -----	241
Anexo 3.1 Construcción de mutantes en sistemas de síntesis de trehalosa de <i>S. meliloti</i> 1021 -----	243
Anexo 3.1.1 Construcción de un mutante en el gen <i>otsA</i> de <i>S. meliloti</i> 1021 --	243
Anexo 3.1.2 Construcción de un mutante en el gen <i>treY</i> de <i>S. meliloti</i> 1021 --	245
Anexo 3.1.3 Construcción de un mutante en el gen <i>treS</i> de <i>S. meliloti</i> 1021 --	247
Anexo 3.1.4 Construcción de los mutantes dobles y el mutante triple en rutas de síntesis de trehalosa de <i>S. meliloti</i> 1021 -----	249
Anexo 3.2 Construcción de mutantes en sistemas de síntesis de trehalosa de <i>M. loti</i> MAFF303099 -----	251
Anexo 3.2.1 Construcción de un mutante en el gen <i>otsA1</i> de <i>M. loti</i> MAFF303099 -----	251
Anexo 3.2.2 Construcción de un mutante en el gen <i>otsA2</i> de <i>M. loti</i> MAFF303099 -----	253
Anexo 3.3 Construcción de fusiones transcripcionales de los genes de sistemas de síntesis de trehalosa de <i>S. meliloti</i> 1021 -----	255
Anexo 3.3.1 Construcción de una fusión transcripcional al gen <i>otsA</i> de <i>S. meliloti</i> 1021 -----	255
Anexo 3.3.2 Construcción de una fusión transcripcional al gen <i>treY</i> de <i>S. meliloti</i> 1021 -----	255
CONCLUSIONES -----	257
BIBLIOGRAFÍA -----	261

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1.1 -----	61
Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo	
Tabla 1.2 -----	62
Plásmidos utilizados en este trabajo	
Tabla 9.1 -----	83
Cebadores utilizados en este trabajo	
Tabla R2.1 -----	119
Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen <i>kdpA</i> (SMa2333) de <i>S. meliloti</i> 1021 y las de otros rizobios	
Tabla R2.2 -----	120
Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen <i>kup1</i> (SMc00873) de <i>S. meliloti</i> 1021 y las de otros rizobios	
Tabla R2.3 -----	121
Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen <i>kup2</i> (SMa1798) de <i>S. meliloti</i> 1021 y las de otros rizobios	
Tabla R2.4 -----	122
Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen <i>kup1</i> (mll1417) de <i>M. loti</i> MAFF303099 y las de otros rizobios	
Tabla R2.5 -----	123
Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen <i>kup2</i> (mll1416) de <i>M. loti</i> MAFF303099 y las de otros rizobios	
Tabla R3.1 -----	184
Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen <i>otsA</i> (SMa0322) de <i>S. meliloti</i> 1021 y las de otros rizobios	
Tabla R3.2 -----	185
Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen <i>otsA2</i> (mll0691) de <i>M. loti</i> MAFF303099 y las de otros rizobios	
Tabla R3.3 -----	186
Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen <i>otsB</i> (mll0690) de <i>M. loti</i> MAFF303099 y las de otros rizobios	
Tabla R3.4 -----	187
Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen <i>treY</i> (SMb20574) de <i>S. meliloti</i> 1021 y las de otros rizobios	
Tabla R3.5 -----	188
Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen <i>glgB2</i> (SMb21447) de <i>S. meliloti</i> 1021 y las de otros rizobios	
Tabla R3.6 -----	189
Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen <i>treS</i> (SMb20099) de <i>S. meliloti</i> 1021 y las de otros rizobios	

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura I1 -----	12
Representación esquemática del transportador de potasio de alta afinidad Kdp de <i>E. coli</i> .	
Figura I2 -----	13
Representación esquemática del sistema regulador KdpDE	
Figura I3 -----	14
Representación esquemática del transportador de baja afinidad TrkH	
Figura I4 -----	16
Representación esquemática del transportador de baja afinidad Kup	
Figura I5 -----	21
Transporte de colina y síntesis de glicina betaína en <i>E. coli</i>	
Figura I6 -----	26
Representación esquemática de la síntesis de trehalosa por la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) y la trehalosa-6-fosfato fosfatasa	
Figura I7 -----	27
Representación esquemática de la síntesis de trehalosa mediante la trehalosa sintasa (TS)	
Figura I8 -----	28
Representación esquemática de la síntesis de trehalosa mediante la maltooligosil trehalosa sintasa (MOTS) y la maltooligosil trehalosa trehalohidrolasa (MOTTH)	
Figura I9 -----	28
Representación esquemática de la síntesis de trehalosa por la trehalosa fosforilasa (TreP)	
Figura I10 -----	29
Representación esquemática de la síntesis de trehalosa por la trehalosa glucosiltransferasa (TreT)	
Figura R1.1 -----	99
Número de genes que se inducen o se reprimen a lo largo del tiempo	
Figura R1.2 -----	99
Valores medios de inducción y represión a lo largo del tiempo	
Figura R1.3 -----	100
Distribución de genes inducidos y reprimidos en los tres replicones de <i>S. meliloti</i> 1021	
Figura R1.4 -----	101
Categorías funcionales en que se distribuyen los genes que se inducen o se reprimen tras un choque hiperosmótico	
Figura R1.5 -----	112
Variación del número de genes considerados como inducidos o reprimidos en cualquiera de las condiciones estudiadas a lo largo del tiempo	

	Página
Figura R2.1 -----	125
Curvas de crecimiento de <i>S. meliloti</i> 1021 en medio mínimo adicionado de NaCl a distintas concentraciones	
Figura R2.2 -----	125
Curvas de crecimiento de <i>S. meliloti</i> 1021 en medio mínimo adicionado de sacarosa a distintas concentraciones	
Figura R2.3 -----	126
Curvas de crecimiento de <i>M. loti</i> MAFF303099 en medio mínimo adicionado de NaCl a distintas concentraciones	
Figura R2.4 -----	126
Curvas de crecimiento de <i>M. loti</i> MAFF303099 en medio mínimo adicionado de sacarosa a distintas concentraciones	
Figura R2.5 -----	127
Crecimiento en TY de mutantes en sistemas de transporte de potasio de <i>S. meliloti</i> 1021	
Figura R2.6 -----	128
Curvas de crecimiento en medio mínimo de los distintos mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de sistemas de transporte de potasio	
Figura R2.7 -----	129
Curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 300 mM NaCl de los distintos mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de sistemas de transporte de potasio	
Figura R2.8 -----	130
Curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 400 mM NaCl de los distintos mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de sistemas de transporte de potasio	
Figura R2.9 -----	131
Curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 500 mM NaCl de los distintos mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de sistemas de transporte de potasio	
Figura R2.10 -----	132
Curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 500 mM sacarosa de los distintos mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de sistemas de transporte de potasio	
Figura R2.11 -----	133
Curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 700 mM sacarosa de los distintos mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de sistemas de transporte de potasio	
Figura R2.12 -----	136
Crecimiento en medio mínimo sólido a distintos pHs de los mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de sistemas de transporte de potasio	
Figura R2.13 -----	137
Crecimiento en medio mínimo sólido adicionado de 300 mM NaCl a distintos pHs de los mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de sistemas de transporte de potasio	
Figura R2.14 -----	138
Crecimiento en medio mínimo sólido adicionado de 400 mM NaCl a distintos pHs de los mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de sistemas de transporte de potasio	

	Página
Figura R2.15 ----- Crecimiento en medio mínimo sólido adicionado de 500 mM NaCl a distintos pHs de los mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de sistemas de transporte de potasio	139
Figura R2.16 ----- Crecimiento en medio mínimo sólido adicionado de 500 mM sacarosa a distintos pHs de los mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de sistemas de transporte de potasio	140
Figura R2.17 ----- Crecimiento en medio mínimo sólido adicionado de 600 mM sacarosa a distintos pHs de los mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de sistemas de transporte de potasio	141
Figura R2.18 ----- Crecimiento en medio mínimo sólido adicionado de 700 mM sacarosa a distintos pHs de los mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de sistemas de transporte de potasio	142
Figura R2.19 ----- Cinéticas de nodulación de los mutantes simples de <i>S. meliloti</i> en genes de sistemas de transporte de potasio y del doble mutante 10K1K2 (Kup1 ⁻ , Kup2 ⁻)	144
Figura R2.20 ----- Cinéticas de nodulación de los mutantes derivados de <i>S. meliloti</i> derivados de 10tAG (Trk ⁻)	145
Figura R2.21 ----- Representación de la actividad reductora de acetileno, el número de nódulos por planta y el peso seco de la parte aérea de plantas de <i>M. sativa</i> (var. Aragón) inoculadas con <i>S. meliloti</i> 1021, 10tAG (Trk ⁻) o 10K1K (Kup1 ⁻) en ausencia o presencia de 75 mM NaCl	147
Figura R2.22 ----- Curvas de crecimiento de MKdpT (Kdp ⁻) en medio mínimo adicionado de distintas concentraciones de NaCl o sacarosa	149
Figura R2.23 ----- Curvas de crecimiento de MKup2 (Kup2 ⁻) en medio mínimo adicionado de distintas concentraciones de NaCl o sacarosa	150
Figura R2.24 ----- Crecimiento en medio mínimo sólido a distintos pHs de los mutantes de <i>M. loti</i> en sistemas de transporte de potasio	151
Figura R2.25 ----- Crecimiento en medio mínimo sólido adicionado de distintas concentraciones de NaCl y a diferentes pHs, de los mutantes de <i>M. loti</i> en sistemas de transporte de potasio	152
Figura R2.26 ----- Crecimiento en medio mínimo sólido adicionado de distintas concentraciones de sacarosa y a diferentes pHs, de los mutantes de <i>M. loti</i> en sistemas de transporte de potasio	153
Figura R2.27 ----- Representación de la actividad reductora de acetileno, el número de nódulos por planta y el peso seco de la parte aérea de plantas de <i>L. tenuis</i> inoculadas con <i>M. loti</i> MAFF303099, MKdpT o MKup2	155
Figura A2.1 ----- Representación esquemática de la construcción del mutante 10tAG	168

	Página
Figura A2.2 -----	169
Comprobación de mutantes en el sistema Trk de <i>S. meliloti</i> 1021	
Figura A2.3 -----	170
Representación esquemática de la construcción del mutante 10KdpSS	
Figura A2.4 -----	171
Comprobación de mutantes 10KdpSS de <i>S. meliloti</i> mediante hibridación	
Figura A2.5 -----	172
Representación esquemática de la construcción del mutante 10K1K	
Figura A2.6 -----	173
Comprobación de mutantes 10K1K de <i>S. meliloti</i> mediante hibridación	
Figura A2.7 -----	174
Representación esquemática de la construcción del mutante 10K2SS	
Figura A2.8 -----	175
Comprobación de mutantes 10K2SS de <i>S. meliloti</i> mediante hibridación	
Figura A2.9 -----	178
Representación esquemática de la construcción del mutante MKdpT	
Figura A2.10 -----	178
Comprobación de mutantes MKdpT de <i>M. loti</i> mediante hibridación	
Figura A2.11 -----	180
Representación esquemática de la construcción del mutante MKup2	
Figura A2.12 -----	180
Comprobación de mutantes MKup2 de <i>M. loti</i> mediante hibridación	
Figura R3.1 -----	191
Curvas de crecimiento en medio mínimo de los distintos mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de síntesis de trehalosa	
Figura R3.2 -----	192
Curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 300 mM NaCl de los distintos mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de síntesis de trehalosa	
Figura R3.3 -----	193
Curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 400 mM NaCl de los distintos mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de síntesis de trehalosa	
Figura R3.4 -----	194
Curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 500 mM NaCl de los distintos mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de síntesis de trehalosa	
Figura R3.5 -----	195
Curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 500 mM sacarosa de los distintos mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de síntesis de trehalosa	
Figura R3.6 -----	196
Curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 700 mM sacarosa de los distintos mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de síntesis de trehalosa	

	Página
Figura R3.7 -----	198
Curvas de crecimiento de <i>S. meliloti</i> 1021 y 10SYOt en medio mínimo al que se adicionó NaCl hasta alcanzar distintas concentraciones durante la fase exponencial	
Figura R3.8 -----	199
Efecto protector de la trehalosa exógena sobre el crecimiento de <i>S. meliloti</i>	
Figura R3.9 -----	200
Crecimiento de los mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de síntesis de trehalosa en medio mínimo sólido a distintos pHs	
Figura R3.10 -----	201
Crecimiento de los mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de síntesis de trehalosa en medio mínimo sólido a distintos pHs y adicionado de 400 mM NaCl	
Figura R3.11 -----	202
Crecimiento de los mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de síntesis de trehalosa en medio mínimo sólido a distintos pHs y adicionado de 600 mM sacarosa	
Figura R3.12 -----	203
Crecimiento de los mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de síntesis de trehalosa en medio mínimo sólido a distintos pHs y adicionado de 500 mM NaCl	
Figura R3.13 -----	204
Crecimiento de los mutantes de <i>S. meliloti</i> en genes de síntesis de trehalosa en medio mínimo sólido a distintos pHs y adicionado de 700 mM sacarosa	
Figura R3.14 -----	205
Expresión de la fusión transcripcional <i>otsA::uidA</i> en <i>S. meliloti</i> 1021, en presencia o ausencia de NaCl	
Figura R3.15 -----	206
Expresión de la fusión transcripcional <i>treY::uidA</i> en <i>S. meliloti</i> 1021, en presencia o ausencia de NaCl	
Figura R3.16 -----	208
Expresión de la fusión transcripcional <i>otsA::uidA</i> en <i>S. meliloti</i> 1021, en respuesta a la adición de NaCl durante la fase de crecimiento exponencial	
Figura R3.17 -----	209
Expresión de la fusión transcripcional <i>treY::uidA</i> en <i>S. meliloti</i> 1021, en respuesta a la adición de NaCl durante la fase de crecimiento exponencial	
Figura R3.18 -----	210
Trehalosa acumulada por <i>S. meliloti</i> 1021 durante su crecimiento en medio mínimo	
Figura R3.19 -----	211
Trehalosa acumulada por <i>S. meliloti</i> 1021 30 horas después de un choque osmótico utilizando distintas concentraciones de NaCl	
Figura R3.20 -----	212
Trehalosa acumulada por los mutantes de <i>S. meliloti</i> 1021 en respuesta a la adición de 600 mM NaCl durante la fase de crecimiento exponencial	
Figura R3.21 -----	215
Cinéticas de nodulación de los distintos mutantes de <i>S. meliloti</i> en sistemas de síntesis de trehalosa	

	Página
Figura R3.22 -----	216
Cinética de nodulación del triple mutante 10SYOt (TreS ⁻ , TreY ⁻ , OtsA ⁻) en solución nutritiva adicionada de 75 mM NaCl en el momento de la inoculación	
Figura R3.23 -----	216
Porcentaje de ocupación de nódulos de los mutantes dobles y el triple en sistemas de síntesis de trehalosa de <i>S. meliloti</i> tras inocular con la cepa 1021 (pGUS3) en una proporción 1:1.	
Figura R3.24 -----	218
Representación de la actividad reductora de acetileno, el número de nódulos por planta y el peso seco de la parte aérea de plantas de <i>M. sativa</i> (var. Aragón) inoculadas con <i>S. meliloti</i> 1021 o 10SYOt (TreS ⁻ , TreY ⁻ , OtsA ⁻) en ausencia o presencia de 75 mM NaCl	
Figura R3.25 -----	220
Curvas de crecimiento en medio mínimo de los mutantes de <i>M. loti</i> en sistemas de síntesis de trehalosa	
Figura R3.26 -----	221
Curvas de crecimiento de MOtSS (OtsA1 ⁻) en medio mínimo adicionado de distintas concentraciones de NaCl o sacarosa	
Figura R3.27 -----	222
Curvas de crecimiento de MOt2K (OtsA2 ⁻) en medio mínimo adicionado de distintas concentraciones de NaCl o sacarosa	
Figura R3.28 -----	223
Crecimiento en medio mínimo sólido a distintos pHs de los mutantes de <i>M. loti</i> en genes de síntesis de trehalosa	
Figura R3.29 -----	224
Crecimiento en medio mínimo sólido adicionado de distintas concentraciones de NaCl y a diferentes pHs, de los mutantes de <i>M. loti</i> en genes de síntesis de trehalosa	
Figura R3.30 -----	225
Crecimiento en medio mínimo sólido adicionado de distintas concentraciones de sacarosa y a diferentes pHs, de los mutantes de <i>M. loti</i> en genes de síntesis de trehalosa	
Figura R3.31 -----	226
Trehalosa acumulada en los mutantes de <i>M. loti</i> en respuesta a la adición de 250 mM NaCl durante la fase de crecimiento exponencial	
Figura R3.32 -----	227
Representación de la actividad reductora de acetileno, el número de nódulos por planta y el peso seco de la parte aérea de plantas de <i>L. tenuis</i> inoculadas con <i>M. loti</i> MAFF303099, MOtSS o MOt2K	
Figura A3.1 -----	244
Representación esquemática del fragmento amplificado para la construcción del mutante 10OtSS	
Figura A3.2 -----	244
Comprobación de mutantes 10OtSS de <i>S. meliloti</i> mediante hibridación	
Figura A3.3 -----	246
Representación esquemática de la construcción del mutante 10MOTK	

	Página
Figura A3.4 ----- Comprobación de mutantes 10MOTK de <i>S. meliloti</i> mediante hibridación	246
Figura A3.5 ----- Representación esquemática de la construcción del mutante 10treS	248
Figura A3.6 ----- Comprobación de mutantes 10treS de <i>S. meliloti</i> mediante hibridación	248
Figura A3.7 ----- Representación esquemática de la construcción del mutante MOtSS	252
Figura A3.8 ----- Comprobación de mutantes MOtSS de <i>M. loti</i> mediante hibridación	252
Figura A3.9 ----- Representación esquemática de la construcción del mutante MOt2K	254
Figura A3.10 ----- Comprobación de mutantes MOt2K de <i>M. loti</i> mediante hibridación	254
Figura A3.11 ----- Representación esquemática de la construcción del plásmido p53otsA	255
Figura A3.12 ----- Representación esquemática de la construcción del plásmido p53MOTS	256

Introducción

I. OSMOADAPTACIÓN EN BACTERIAS

Todos los organismos vivos se encuentran expuestos a cambios de los factores biológicos, químicos y físicos que definen su hábitat y, para su supervivencia, deben ser capaces de detectar dichos cambios y de reaccionar utilizando diversos mecanismos de adaptación. La presión osmótica del medio es uno de los parámetros físicos que determinan la capacidad de los organismos para proliferar en un determinado ambiente. Los cambios en la osmolaridad del medio no son relevantes únicamente para organismos de hábitats salinos sino también para muchos otros seres vivos. Por ejemplo, en el suelo, las precipitaciones seguidas por evaporación del agua pueden causar variaciones drásticas en la osmolaridad.

Las células bacterianas mantienen una presión osmótica intracelular superior a la del medio. Puesto que estas células tienen una pared semirrígida que rodea a la membrana celular, cuando el agua difunde hacia el interior, la membrana se expande hasta ejercer una presión sobre la pared que se denomina presión de turgor. Se ha propuesto que la presión de turgor proporciona la fuerza mecánica necesaria para la expansión de la pared celular durante el crecimiento y la división celular (Welsh, 2000). Aunque es bastante difícil determinar el turgor celular, se han estimado valores de entre 3 y 10 bares en bacterias Gram-negativas y de unos 20 bares en Gram-positivas (Whatmore y Reed, 1990; Csonka y Epstein, 1996).

1. ESTRATEGIAS DE OSMOADAPTACIÓN

La membrana citoplasmática de las bacterias es permeable al agua pero constituye una barrera efectiva frente a la mayoría de los solutos presentes en el medio y de los metabolitos citoplasmáticos. Una disminución de la disponibilidad de agua causada por la exposición a condiciones hiperosmóticas, amenaza a las células con una drástica pérdida hídrica y una caída de la presión de turgor (Poolman y Glaasker, 1998). La

salida de agua puede llegar a provocar la retracción de la membrana citoplasmática de la pared celular. Este proceso, conocido como plasmolisis, se detecta como un incremento instantáneo en la turbidez del cultivo sometido a un aumento de la osmolaridad del medio. Si el choque hiperosmótico no es demasiado severo, la plasmolisis es transitoria y, tras un corto periodo de tiempo, el volumen citoplasmático se recupera como resultado de la adaptación osmótica de la célula.

El término osmoadaptación describe las manifestaciones fisiológicas y genéticas de la adaptación a ambientes con variaciones en la disponibilidad de agua (Galinski, 1995). La multiplicidad y redundancia de los mecanismos homeostáticos son marcas de la respuesta a estrés en bacterias. Este hecho complica los esfuerzos para elucidar las relaciones entre los mecanismos de tolerancia a estrés, la virulencia bacteriana y su incidencia en las enfermedades humanas y animales. La redundancia de los mecanismos osmorreguladores en bacterias se definió primero mediante estudios con *Escherichia coli* K12 y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Csonka y Epstein, 1996), e incluso se ha observado una mayor redundancia en bacterias Gram-positivas como *Bacillus subtilis* (Kempf y Bremer, 1998) o *Corynebacterium glutamicum* (Morbach y Krämer, 2002).

Las células vivas han desarrollado dos estrategias principales para mantener el turgor celular y evitar la pérdida de agua ocasionada por un aumento en la osmolaridad del medio: una basada en la acumulación de “sal en el citoplasma” y otra en la acumulación de osmolitos orgánicos. La adaptación a medios hipoosmóticos implica la extrusión de solutos, que puede ser específica o inespecífica, así como un eflujo de agua mediado por acuaporinas (Sleator y Hill, 2001). En nuestro caso, resulta de particular interés el estudio de la adaptación a ambientes hiperosmóticos, por lo que nos centraremos en este proceso, dejando a un lado la respuesta a ambientes hipoosmóticos.

1.1. Acumulación de “Sal en el citoplasma”

La estrategia de adaptación a condiciones hiperosmóticas conocida como “sal en el citoplasma” consiste en la acumulación de iones inorgánicos, principalmente potasio y cloro, hasta niveles citoplasmáticos semejantes a los extracelulares (Galinski y Trüper, 1994). Este mecanismo puede encontrarse en halófilos extremos como las arqueas de la familia *Halobacteriaceae*, halófilos anaerobios como las eubacterias del orden *Haloanaerobiales* y el hiperhalófilo *Salinibacter ruber*, una eubacteria relacionada con el orden *Cytophagales* (Sleator y Hill, 2001; Oren *et al.*, 2002). Como consecuencia de la acumulación de iones inorgánicos, el citoplasma de estos organismos presenta fuerzas iónicas muy elevadas, que requieren adaptaciones estructurales.

Para permitir la tolerancia a altas concentraciones de sal, las proteínas se enriquecen en aminoácidos ácidos, como aspártico y glutámico, mientras que son relativamente pobres en aminoácidos ligeramente hidrofóbicos (Sleator y Hill, 2001). Estas modificaciones pueden explicarse por la necesidad de atraer un escudo de hidratación en un ambiente de baja actividad de agua.

El efecto general de la sal en el citoplasma es la estabilización de las estructuras proteicas provocada por el fortalecimiento de las interacciones hidrofóbicas. De este modo se favorece el mantenimiento de la conformación de la proteína plegada. Una reducción en la concentración de sal conduce a un debilitamiento de la conformación enzimática, debido a la aparición de fuerzas de repulsión entre las cargas negativas que se acumulan en la superficie proteica al eliminarse los cationes. En consecuencia, los organismos que presentan esta estrategia de adaptación a medios hiperosmóticos se encuentran estrictamente confinados a este tipo de ambientes (Galinski y Trüper, 1994). De hecho, las envueltas celulares de la mayoría de las halobacterias son estructuralmente inestables fuera de su hábitat y se vuelven lábiles a concentraciones de NaCl inferiores a 1 M (Welsh, 2000).

1.2. Acumulación de solutos compatibles

En eubacterias, actinomicetos, algas, hongos y levaduras, el proceso de osmoadaptación depende de osmolitos orgánicos de bajo peso molecular llamados “solutos compatibles”, cuya acumulación, ya sea mediante transporte desde el exterior, o mediante síntesis *de novo*, no interfiere con el desarrollo de los procesos celulares vitales (Brown, 1976). Esta estrategia de osmoadaptación tiene unos requisitos mínimos y un alto grado de flexibilidad, por lo que permite a los organismos adaptarse a fluctuaciones significativas en la osmolaridad del medio; se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y está evolutivamente conservada en los tres grandes dominios (Kempf y Bremer, 1998; Roberts, 2000).

2. SOLUTOS COMPATIBLES

Los solutos compatibles se definen como compuestos orgánicos altamente solubles y con un pequeño tamaño molecular, que no interfieren con el metabolismo central incluso cuando se acumulan a altas concentraciones (Brown, 1976). En general, son moléculas neutras a pH fisiológico que no interactúan con las proteínas.

Estos solutos se sintetizan o captan del medio acumulándose a elevadas concentraciones, de modo que equilibran la presión osmótica del medio externo manteniendo la turgencia celular, sin interferir en procesos celulares básicos como la reparación de ADN, las interacciones ADN-proteína o la maquinaria metabólica celular (Record *et al.*, 1998a, b; Strøm y Kaasen, 1993).

El espectro de solutos compatibles conocidos incluye un número limitado de compuestos: azúcares (sacarosa, trehalosa), polioles (glicerol, glucosil glicerol), aminoácidos libres (prolina, glutamato), amidas cuaternarias y sus análogos sulfatados (glicina betaína, carnitina, dimetil sulfonil propionato), ésteres sulfato (colina O-sulfato) y diaminoácidos acetilados y pequeños péptidos (N-acetil ornitina, N-acetil glutaminil glutamina amida). El uso de sólo un pequeño número de compuestos como solutos compatibles refleja una limitación fundamental en el tipo de moléculas que son

compatibles con el metabolismo celular y puede relacionarse además con la utilización de estos compuestos para diversas funciones y no sólo en la adaptación a estrés osmótico.

Por otra parte, la mayoría de los organismos no utilizan un único compuesto sino que acumulan una mezcla de solutos compatibles en respuesta a un estrés hiperosmótico cuya composición depende del organismo, de la fase de crecimiento, de las condiciones fisiológicas de la célula y de la composición del medio de cultivo (Galinski y Trüper, 1994).

2.1. Funciones de los solutos compatibles

Además de su papel osmoprotector, los solutos compatibles pueden tener otras funciones en la célula. Por ejemplo, su capacidad para acumularse hasta concentraciones muy elevadas en el citoplasma les permite constituir importantes reservas de carbono o nitrógeno, actuando como un sistema de almacenamiento de nutrientes y energía.

Muchos solutos compatibles han demostrado ser efectivos estabilizadores enzimáticos y proporcionar protección no sólo frente a elevadas concentraciones de sal, sino también frente a altas temperaturas, ciclos de congelación y descongelación, o desecación (Welsh, 2000). Por ejemplo, la trehalosa se acumula en *E. coli* en fase estacionaria y en respuesta a condiciones adversas, protegiendo a la bacteria del estrés osmótico, térmico y oxidativo o frente a procesos de congelación y desecación (Hengge-Aronis, 1996; Kandrór *et al.*, 2002; Sunda *et al.*, 2002; Benaroudj *et al.*, 2001). La glicina betaína, un osmoprotector ampliamente utilizado, promueve la tolerancia al frío de *Listeria monocytogenes* (Smith, 1996) y el dimetil sulfonil propionato (DMSP) también alivia el estrés oxidativo en *E. coli* (Sunda *et al.*, 2002).

La exclusión preferencial de la superficie de proteínas y otras macromoléculas citoplasmáticas es la base de la naturaleza compatible de estos osmolitos (Arakawa y Timasheff, 1985). De acuerdo con el modelo de exclusión preferencial, la distribución de los solutos compatibles no es homogénea en el citoplasma celular sino que se mantienen alejados de las proteínas, de modo que se favorece la hidratación de las

superficies proteicas. Esta distribución de los solutos conduce a una situación en la que la rotura de la estructura del escudo de hidratación de las proteínas es energéticamente desfavorable. El resultado termodinámico es un efecto general de estabilización que se opone a la desnaturalización de las proteínas y otras estructuras macromoleculares (Baskakov y Bolen, 1998). Dicha estabilización se extiende no sólo a la tolerancia a sal sino también a un amplio rango de factores de estrés como altas o bajas temperaturas, congelación o desecación (Welsh, 2000).

La exclusión preferencial de estos solutos de las superficies de los biopolímeros, provocaría teóricamente una tendencia generalizada de todos los biopolímeros celulares hacia formas con el mínimo de superficie expuesta, de tal manera que todos los equilibrios celulares se desplazarían hacia la aparición de formas plegadas y multiméricas, la asociación de complejos y la formación de agregados. Sin embargo, se sabe que los solutos compatibles no afectan prácticamente a las actividades enzimáticas (Neuhofer *et al.*, 2002) y tampoco aumentan la estabilidad de los complejos proteicos (Fried *et al.*, 2002; Anjum *et al.*, 2000). La explicación más probable de este hecho es que la exclusión de los solutos compatibles de las superficies proteicas no sea un fenómeno generalizado sino exclusivo de algún tipo concreto de superficie, indicativo de una desnaturalización. En este sentido, se ha propuesto que el efecto estabilizador de los solutos compatibles procede de la exclusión de estas moléculas del esqueleto peptídico de las proteínas. Esto puede explicar la estabilización de proteínas globulares, como la albúmina, ya que la exclusión preferencial se produciría cuando quedaran expuestas zonas normalmente internas (Auton *et al.*, 2001; Bolen y Baskakov, 2001). Tal y como predice el modelo osmofóbico de estabilidad proteica (Bolen y Baskakov, 2001), las comparaciones cuantitativas de la interacción preferente de la glicina betaína (un potente osmoprotector) con distintas superficies de biopolímeros plegados o desnaturalizados han permitido determinar que la exclusión de esta molécula aumenta con la fracción de oxígeno aniónico presente en dichas superficies (debido a los grupos carboxilato en las proteínas y a los fosfato en el ADN) (Hong *et al.*, 2004; Felitsky *et al.*, 2004).

Además de la teoría sobre la protección de las proteínas, Cayley y colaboradores (1992) propusieron que el volumen de agua citoplasmática libre (aquella que no se encuentra unida a las superficies moleculares) es un determinante fundamental del crecimiento en condiciones de estrés hiperosmótico y que la clave de la función osmoprotectora de los solutos compatibles es el incremento del volumen celular causado por su acumulación (consecuencia de la exclusión preferente de las macromoléculas citoplasmáticas y los componentes de membrana). Así, los solutos compatibles pueden tener un papel dual en la osmorregulación celular, restaurando el volumen celular y estabilizando las estructuras proteicas.

3. RESPUESTA A UN CHOQUE HIPEROSMÓTICO

De modo habitual se considera que un choque hiperosmótico provoca una respuesta bifásica en las células afectadas. Durante la primera fase de esta respuesta, las células acumulan potasio que captan del medio y durante la segunda fase, dicho potasio es sustituido por solutos compatibles. Algunos autores consideran la existencia de una fase previa a la captación de potasio. Se trata en realidad de un corto periodo de tiempo en el que tienen lugar los procesos osmosensores que conducen a la activación de la osmoadaptación celular. En *E. coli*, esta fase comienza apenas pasados unos milisegundos de la aplicación del choque osmótico y se prolonga durante 1-2 minutos. También la fase de captación de potasio comienza inmediatamente después del choque osmótico, pero se prolonga hasta pasados 10 o 20 minutos en el caso de bacterias cultivadas en presencia de compuestos osmoprotectores, y unos 40 minutos en el caso de bacterias cultivadas en ausencia de dichos compuestos.

Durante esta fase previa, la célula responde de modo pasivo al cambio en las condiciones osmóticas del medio. Ante un choque hiperosmótico se produce una reducción de la actividad de agua en el citoplasma por lo que la célula se deshidrata y su volumen disminuye. Se sabe que la tasa de respiración decae y los niveles de ATP aumentan transitoriamente (Meury, 1994; Houssin *et al.*, 1991). También se produce un

ligero incremento del pH citoplasmático que revierte en los primeros 20 minutos, se suspenden la mayoría de los procesos de transporte celular, aunque se activan transportadores relacionados con la respuesta a estrés osmótico (Trk y ProP), y se produce una inhibición transitoria de la replicación del ADN (Wood, 1999).

Todas estas respuestas se solapan en el tiempo con lo que de modo generalizado se considera la primera fase de la osmoadaptación celular: la captación de potasio.

3.1. Captación de potasio

La respuesta más rápida a un choque hiperosmótico, tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas, es la estimulación de la captación de potasio.

Los iones de potasio son los cationes prevalentes en el citoplasma de las bacterias, y, en consecuencia, actúan como uno de los osmolitos intracelulares más importantes para el mantenimiento de la presión de turgor. Se sabe desde hace tiempo que la concentración intracelular de potasio es proporcional a la osmolaridad del medio de cultivo y que hay una correlación positiva entre el contenido intracelular de este catión y la capacidad de las bacterias para tolerar condiciones de alta osmolaridad (Christian y Waltho, 1961).

Sin embargo, la comprensión del papel del potasio en la osmorregulación surge del trabajo de Epstein y Schultz, que ya en 1965 observaron que, en *E. coli*, la concentración intracelular de potasio se incrementaba cuando la osmolaridad del medio aumentaba fuera cual fuese el soluto utilizado, siempre y cuando se tratara de solutos incapaces de difundir a través de la membrana (por ejemplo, glucosa, sacarosa y NaCl).

Dinnbier y colaboradores (1988) y Ohwada y Sagisaka (1988) establecieron que la acumulación de potasio era un proceso transitorio tras un choque hiperosmótico y que 30 minutos después de la exposición de *E. coli* al medio hipertónico, las células en realidad excretaban potasio, de modo que dicho catión era reemplazado por trehalosa en los primeros 60 minutos tras el choque osmótico. Estos investigadores concluyeron que la concentración intracelular de potasio en bacterias que se han adaptado completamente al estrés osmótico no era muy diferente de la concentración previa al estrés.

Transportador Kdp

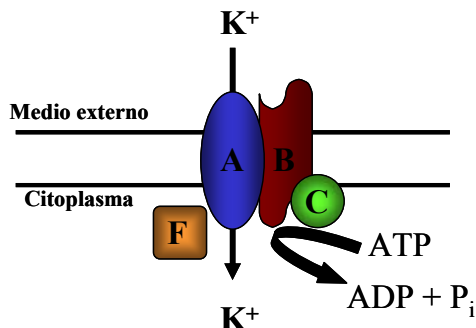


Figura 11.- Representación esquemática del transportador de potasio de alta afinidad Kdp de *E. coli*. Este sistema se induce en condiciones de elevada osmolaridad y baja concentración de potasio en el medio.

Las mutaciones que afectan a la unión al ion y a la selectividad del sistema se encuentran agrupadas en regiones definidas de la subunidad KdpA (Bertrand *et al.*, 2004). Se sabe que para la necesaria comunicación entre los sitios de hidrólisis de ATP y el transporte iónico son esenciales dos residuos cargados conservados en una hélice transmembrana de KdpB (Bramkamp y Altendorf, 2005). Hay muchos menos datos sobre las subunidades menores KdpF y KdpC. Mientras que la primera actúa estabilizando el complejo *in vitro*, la segunda se considera una parte esencial del transportador y se cree que actúa uniéndose a ATP con baja afinidad (Gassel y Altendorf, 2001; Ahnert *et al.*, 2006) y presentándose a KdpB, cuyo sitio de unión a nucleótidos se encuentra cerca del sitio de unión a ATP de KdpC en el complejo ensamblado (Haupt *et al.*, 2006).

3.1.2. Regulación de la captación de potasio por el sistema Kdp

El sistema Kdp tiene una afinidad por el potasio en el rango micromolar, lo que encaja con su patrón de expresión ya que sólo se induce cuando la concentración de potasio exterior es demasiado baja para satisfacer los requerimientos de potasio mediante los sistemas Trk y Kup. Las células que utilizan sólo el sistema Kdp pueden llegar a alcanzar concentraciones intracelulares de potasio 2-3 millones de veces superiores a las del medio externo, lo que puede suponer una concentración de potasio

interna aceptable cuando la concentración exterior está por debajo de 100 nM. Sin embargo, cuando la concentración de potasio del medio está por encima de 1 mM, la actividad del sistema intentaría llevar la concentración interna a más de 200 M, lo que sería un desastre (Roe *et al.*, 2000).

La regulación osmótica del sistema Kdp afecta a su actividad catalítica, tal y como sucede en otros sistemas como Trk. Hay evidencias de que Kdp media el intercambio de potasio sin movimiento neto bajo condiciones no estresantes, mientras que el sistema pasa a una captación neta cuando el turgor baja (Epstein, 1992). De todos modos, se sabe mucho más sobre la regulación transcripcional de los genes *kdp*, que representa uno de los sistemas mejor comprendidos en términos osmosensores (Epstein, 2003). El control de la transcripción del operón *kdp* se encuentra mediado por KdpD y KdpE (Fig. I2), un par de proteínas de la familia de sistemas reguladores de dos componentes encontrados en muchos procariontes (revisado por Ninfa y Atkinson, 2000).

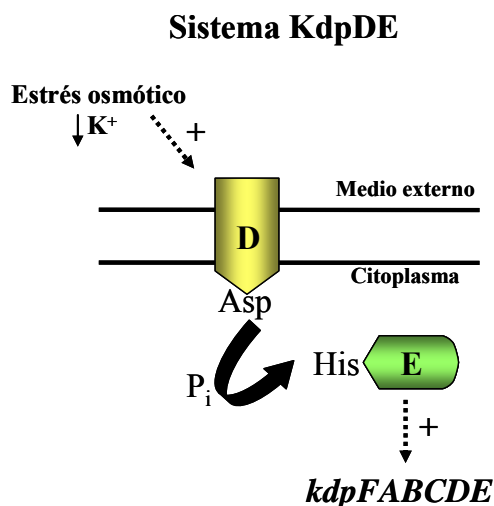


Figura I2.- Representación esquemática del sistema regulador KdpDE, responsable de la inducción de los genes *kdp* en respuesta a estrés osmótico y bajas concentraciones de potasio.

KdpD, la quinasa sensora, es una proteína integral de la membrana interna que, en condiciones de estrés hiperosmótico y limitación de potasio, se autofosforila en un residuo de aspártico citoplasmático. El grupo fosfato se transfiere entonces a una histidina de la proteína reguladora citoplasmática KdpE y dicha proteína fosforilada se une a un operador inmediatamente aguas arriba del promotor del operón *kdp* para activar su transcripción (Sleator y Hill, 2001). La fosforilación de KdpD se produce en

respuesta a elevada osmolaridad y a bajos niveles de potasio. El aislamiento de mutantes insensibles a uno de estos estímulos pero aún capaces de responder al otro (Sugiura *et al.*, 1994; Jung y Altendorf, 1998), respalda la idea de que KdpD reconoce estos dos estímulos de modo independiente.

3.1.3. Sistema Trk

Utilizando mutantes en el sistema Kdp, se encontraron 7 genes cuya mutación provocaba que dichas cepas fueran incapaces de crecer a una concentración de potasio de 0,1 mM: *trkA*, *trkB* (*kefB*), *trkC* (*kefC*), *trkD*, *trkE*, *trkG* y *trkH*. Originalmente se creyó que estos genes representaban al menos tres sistemas independientes de transporte de potasio de baja afinidad, pero luego Epstein y Laimins (1980) sugirieron que componían un único sistema al que denominaron Trk. Posteriormente, Bakker y colaboradores (1987) demostraron que los productos de los genes *trkB* (*kefB*) y *trkC* (*kefC*) estaban implicados en el eflujo de potasio y no en su influjo.

Transportador TrkH

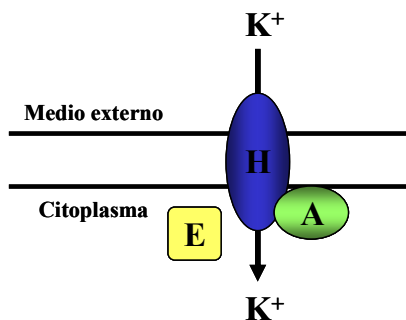


Figura I3.- Representación esquemática del transportador de baja afinidad TrkH. Junto con TrkG, es el transportador de potasio predominante a pH neutro o alcalino en *E. coli*.

Ante un estrés hiperosmótico a pH neutro o ligeramente alcalino y cuando la concentración de potasio es superior a 1 mM, Trk es el sistema predominante de captación de dicho catión (Trchounian & Kobayashi, 2000; Sleator y Hill, 2001). El sistema Trk tiene una afinidad media o baja por el potasio. Al igual que el sistema Kdp, Trk no sólo contribuye a la respuesta a estrés osmótico sino que también actúa en la homeostasis del potasio. Este sistema está codificado por genes de expresión constitutiva que se encuentran dispersos por el cromosoma. El sistema Trk en *E. coli* K-

12 es una suma de dos mecanismos, TrkH (compuesto por los productos de los genes *trkA*, *trkE* y *trkH*) y TrkG (compuesto por los productos de los genes *trkA*, *trkE* y *trkG*).

Los productos de los genes *trkH* y *trkG* son las subunidades implicadas en la translocación de potasio de cada sistema. Son proteínas similares que presentan el 41% de sus residuos idénticos (Schlösser *et al.*, 1995). La razón de que *E. coli* K-12 posea dos sistemas Trk parece ser que *trkG*, una segunda copia de *trkH*, ha sido insertada con el profago *rac* en el cromosoma (Schlösser *et al.*, 1995). Los datos genómicos muestran que la presencia de dos genes tipo *trkH* es una excepción entre los procariotas (Durell *et al.*, 1999). TrkH y TrkG pertenecen a una superfamilia de transportadores de potasio con miembros en plantas, hongos, bacterias y arqueas. Estas proteínas parecen haber evolucionado a partir de simples canales de potasio tipo KcsA mediante al menos dos eventos de duplicación y fusión génica, formando tetrámeros unidos covalentemente con distintas funciones (Durell *et al.*, 1999).

TrkA es una proteína periférica asociada a través de TrkH o TrkG a la cara interna de la membrana plasmática y resulta necesaria para la actividad de los sistemas Trk de *E. coli* y *S. typhimurium*. La proteína TrkA de *E. coli* contiene dos posibles sitios de unión a NAD, pero, aunque se ha observado unión tanto de NAD⁺ como de NADH a la proteína aislada (Schlösser *et al.*, 1993), no se sabe si estos dinucleótidos tienen una función en la actividad del sistema Trk *in vivo* (Stumpe *et al.*, 1996).

Poco se sabe de la función de *trkE*. TrkH requiere la presencia de un gen *trkE* funcional, pero TrkG muestra actividad en su ausencia (Epstein, 2003). Tanto en *S. typhimurium* como en *E. coli*, *trkE* se corresponde con el gen *sapD* del operón *sapABCDF* (Parra-Lopez *et al.*, 1993). Este operón codifica un transportador de tipo ABC del subgrupo implicado en la captación de péptidos (Harms *et al.*, 2001). El hecho de que *trkE* pertenezca al operón *sapABCDF*, devuelve el interés a observaciones tempranas que relacionaban el transporte de potasio por el sistema Trk con la hidrólisis de ATP (Rhoads y Epstein, 1977). Se observa que el sistema es funcional en mutantes de *trkE* capaces de unirse a ATP pero incapaces de hidrolizarlo, lo que apoya la idea de que el ATP es necesario para activar el sistema, mientras que la fuerza protón motriz dirige el proceso de transporte (Harms *et al.*, 2001). Las actividades TrkG (de *E. coli*) y

Trk (de *Vibrio alginolyticus*), que son independientes de *trkE*, mantienen su dependencia de ATP, por lo que puede que estos sistemas sean capaces de interactuar con otras subunidades de unión a ATP de distintos sistemas ABC, lo que ayudaría a explicar la aparente contradicción que de otro modo supone el hecho de que los sistemas Trk estén ampliamente distribuidos entre los procariotas (Durell *et al.*, 1999), mientras que el operón *sapABCD* se encuentre sólo entre las γ -proteobacterias.

3.1.4. Sistema Kup

Kup, anteriormente conocido como TrkD, es un sistema de captación de potasio de baja afinidad constituido por un único componente (revisado por Trchounian, 1997) (Fig. I4). La proteína Kup atraviesa la membrana 12 veces y presenta un dominio adicional en la cara citoplasmática de la membrana. No hay signos de un posible motivo de unión a ATP en la secuencia de la proteína y, al contrario que en el caso de Trk, se sabe que este sistema actúa utilizando exclusivamente la fuerza protón motriz (Trchounian y Kobayashi, 1999).

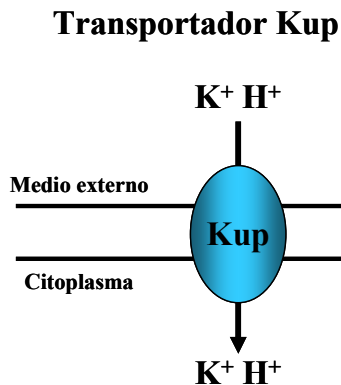


Figura I4.- Representación esquemática del transportador de baja afinidad Kup. Se trata del transportador de potasio predominante a pH ácido en *E. coli*.

El sistema Kup es el principal responsable de la captación de potasio por *E. coli* en condiciones de estrés hiperosmótico a un pH de 5,5, cuando la actividad de Trk es insuficiente y Kdp no se encuentra inducido, y parece actuar como un simportador de potasio y protones (Zakharyan y Trchounian, 2001). Es posible que *E. coli* tenga distintos sistemas de captación de potasio según el pH. Trk funciona principalmente a pH alcalino o neutro y Kup se vuelve importante a bajo pH. Esta idea parece semejante

a la propuesta por Sakuma y colaboradores (1998) para los sistemas de extrusión de sodio de *E. coli*, en los que también hay distintos transportadores actuando según el pH.

3.1.5. Otros sistemas de captación de potasio

La presencia de cualquiera de los tres sistemas de captación de potasio descritos permite el crecimiento de *E. coli* en medios con concentraciones de potasio en el rango milimolar. Cepas mutadas en estos tres sistemas requieren elevadas concentraciones de dicho catión para su crecimiento. La actividad de transporte de potasio en estos mutantes se atribuyó a un sistema no identificado que se llamó TrkF, y que presentaba una baja especificidad de sustrato y una tasa de transporte pequeña que se incrementaba al aumentar el pH del medio externo. Los intentos de aislar mutantes con requerimientos aún más elevados en la concentración de potasio del medio han sido infructuosos, y hoy día se cree que TrkF no es en realidad un sistema de transporte sino un efecto del transporte de potasio a través de diversos sistemas inespecíficos (Buurman *et al.*, 2004).

En conclusión, la acumulación de potasio inducida por estrés osmótico constituye una fase inicial del proceso de osmoadaptación y está mediada por la rápida activación de sistemas de alta y baja afinidad.

3.1.6. Recuperación del equilibrio iónico

No todo el potasio acumulado es osmóticamente activo ya que en parte actúa equilibrando las cargas negativas de las macromoléculas citoplasmáticas. Sólo una fracción de la concentración total de potasio, cuya carga se encuentra equilibrada por otras pequeñas moléculas, contribuye de modo significativo a la actividad osmótica. Inicialmente, para equilibrar las cargas en el citoplasma, la captación de potasio en respuesta a un choque hiperosmótico está acompañada por un eflujo de putrescina, mientras que la putrescina se acumula rápidamente cuando las células se transfieren a un medio de baja osmolaridad (Munro *et al.*, 1972). El intercambio de potasio por putrescina permite elevar la osmolaridad citoplasmática reduciendo el impacto de la acumulación de potasio sobre la concentración iónica del citoplasma (Capp *et al.*,

1996). Sin embargo, la acumulación de potasio, especialmente en células expuestas a medios con una osmolaridad muy elevada, excede la capacidad de equilibrar las cargas de los eflujos de protones y putrescina. Por este motivo debe producirse una acumulación de aniones.

La molécula que actúa de modo primario equilibrando la carga aportada por el potasio durante su acumulación tras un choque hiperosmótico en *E. coli* es el glutamato, el cual comienza a acumularse desde el primer minuto después del choque osmótico en *E. coli*. Puesto que la tasa de síntesis de glutamato es elevada incluso en condiciones de baja osmolaridad, se piensa que la acumulación se produce como consecuencia de una reducción de la utilización del glutamato para la síntesis de otros compuestos nitrogenados (McLaggan *et al.*, 1994). Se estima que los cambios observados en los niveles de potasio, putrescina y glutamato son suficientes para mantener la electroneutralidad celular.

3.2. Acumulación de solutos compatibles

Dado que elevadas concentraciones intracelulares de potasio tienen efectos negativos sobre las funciones enzimáticas, las interacciones ADN-proteínas y la síntesis de proteínas, la captación de potasio es una respuesta inadecuada para la adaptación a periodos prolongados de elevada osmolaridad. Transcurrido un tiempo es necesaria una segunda fase de osmoadaptación que implica la síntesis o la captación de solutos compatibles y el eflujo de potasio (Bremer y Krämer, 2000; Wood *et al.*, 2001).

Los solutos compatibles estimulan el crecimiento bacteriano en medios de alta osmolaridad de modo más efectivo que el potasio y la acumulación de solutos compatibles suprime la acumulación de potasio en respuesta a estrés osmótico (Dinnbier *et al.*, 1988). Al contrario que los solutos compatibles, la acumulación de potasio no parece conferir tolerancia a otros tipos de estrés como el térmico o el oxidativo. La acumulación intracelular de solutos compatibles como estrategia de adaptación a elevada osmolaridad ha sido ampliamente adoptada no sólo por bacterias y arqueas, sino también por hongos, plantas y animales (Galinski y Trüper, 1994; Roberts, 2000; Hohmann, 2002).

El desplazamiento del potasio (y sus contraiones) por solutos compatibles neutros puede darse poco después de la acumulación de estos iones, por ejemplo a través de la captación de glicina betaína o prolina por sistemas de transporte semiconstitutivos como ProP. Sin embargo, aunque la captación de potasio y glicina betaína o prolina puede transcurrir simultáneamente, la captación de potasio por Trk es mucho más rápida y cuantitativamente más importante durante la fase inicial del estrés hiperosmótico. Otros sistemas, como la síntesis de trehalosa y la captación de glicina betaína a través de transportadores de alta afinidad (ProU), requieren inducción y contribuyen a la restauración del turgor más adelante durante el proceso de adaptación a estrés hiperosmótico (Sleator y Hill, 2001).

Los osmoprotectores son compuestos que entran en el citoplasma a través de transportadores osmorregulados y estimulan el crecimiento bacteriano en condiciones hiperosmóticas (Csonka y Epstein, 1996). Normalmente se trata de moléculas que se transportan al interior de la célula, donde se acumulan como solutos compatibles, pero no siempre es así. Los osmoprotectores también pueden ser precursores que se convierten en solutos compatibles tras su captación (por ejemplo la captación de colina vía BetT y su conversión en glicina betaína por BetBA) o incluso moléculas que ejercen una acción protectora sin llegar a acumularse (Gouffi y Blanco, 2000).

Las células pueden sintetizar algunos solutos compatibles tras un choque osmótico y degradarlos tras un choque hipoosmótico. Sin embargo, la respuesta inicial es mucho más rápida si los solutos compatibles o algún precursor inmediato pueden captarse del medio, por lo que en todos los organismos se conocen múltiples transportadores, bien simportadores de iones o transportadores de tipo ABC, con especificidad de sustrato solapante para la captación de osmoprotectores. Los solutos compatibles son liberados al medio por las raíces de plantas vivas, por plantas y animales en descomposición, y por células sujetas a un choque hipoosmótico (Bremer y Krämer, 2000; Glaasker *et al.*, 1996).

Para enfrentarse a condiciones de alta osmolaridad en ausencia de osmoprotectores en el medio, muchas bacterias pueden sintetizar distintos solutos compatibles. Las células tienden a acumular una mezcla de distintos solutos compatibles cuyas

proporciones relativas varían en función de las condiciones ambientales. Por ejemplo, la acumulación de trehalosa como soluto compatible disminuye en medios con limitación de carbono, en los que suelen acumularse solutos nitrogenados como aminoácidos (Welsh *et al.*, 1991). En *C. glutamicum*, las células que crecen en medios con maltosa presentan hasta tres veces más trehalosa que las que crecen utilizando sacarosa (Wolf *et al.*, 2003). La osmoadaptación de *C. salexigens* se debe principalmente a la síntesis *de novo* de ectoína e hidroxiectoína; sin embargo, a elevadas temperaturas parece que la trehalosa sustituye a las ectoínas como soluto compatible (García-Esteva *et al.*, 2006).

A continuación se describen detalladamente los procesos implicados en la acumulación de algunos de los solutos compatibles más estudiados: glicina betaína, prolina y trehalosa.

3.3. Acumulación de glicina betaína

La glicina betaína (N, N, N-trimetil glicina) es el soluto compatible preferido por la mayoría de los procariontes y puede que el osmolito más ampliamente utilizado. Se puede encontrar en plantas, animales, bacterias y arqueas (Bremer y Krämer, 2000; Roeßler y Müller, 2001; Sleator y Hill, 2001). Los primeros estudios sobre osmoprotección bacteriana mediada por glicina betaína se llevaron a cabo en *Tetragenococcus halophilus* (antes conocida como *Pediococcus soyae*) (Sakaguchi, 1960). Sin embargo, hasta principios de los años 80 no se puso en evidencia todo el potencial de este soluto compatible.

3.3.1. Síntesis de glicina betaína

A pesar de la confusión existente en la literatura, la síntesis *de novo* de glicina betaína es rara en la naturaleza y se encuentra confinada a eubacterias fototróficas oxigénicas y anoxigénicas, particularmente aquéllas que muestran una elevada tolerancia a sal (Galinski y Trüper, 1994). Sin embargo, diversos microorganismos como *E. coli* o *B. subtilis*, incapaces de sintetizar glicina betaína *de novo*, pueden obtenerla a partir de colina mediante dos reacciones enzimáticas (Fig. I5).

En *E. coli*, la colina transportada al interior celular a través de los sistemas de alta y baja afinidad BetT y ProU, se utiliza para sintetizar un aldehído de glicina betaína mediante la actuación de la colina deshidrogenasa (BetA). Posteriormente, la glicina betaína aldehído deshidrogenasa (BetB) cataliza una segunda oxidación para dar lugar a glicina betaína (Landfald y Strøm, 1986). Los genes, *betA*, *betB* y *betI* (que codifican las enzimas estructurales implicadas en el proceso y una proteína represora capaz de detectar la presencia de colina en el medio), se encuentran agrupados en un operón (*betIBA*), localizado en el cromosoma aguas abajo del gen *betT* (que codifica el transportador de alta afinidad BetT). Ambos sistemas se transcriben de modo divergente a partir de promotores solapantes (Lamark *et al.*, 1991) y su expresión se encuentra sujeta a inducción por estrés osmótico. La adición de colina (en ausencia de betaína) durante la aplicación de un estrés osmótico provoca una mayor inducción de *betT* y *betIBA* ya que reduce la represión mediada por BetI (Rokenes *et al.*, 1996).

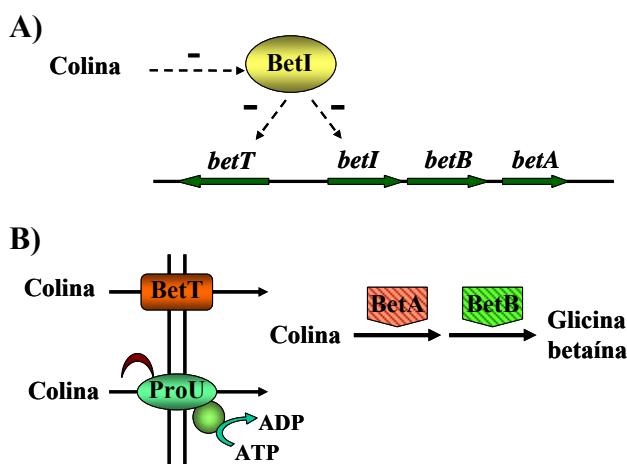


Figura I5.-

A) Regulación de genes del transportador de colina (*betT*) y síntesis de glicina betaína (*betIBA*) por colina.

B) Representación esquemática del proceso de transporte de colina y síntesis de glicina betaína en *E. coli*.

3.3.2. Transporte de glicina betaína

Además de la síntesis endógena, las bacterias poseen sofisticados mecanismos para la captación y acumulación de osmolitos del medio externo. Puesto que la captación de osmolitos es un proceso energéticamente más interesante que su síntesis, la acumulación de solutos compatibles procedentes de fuentes exógenas suele inhibir la síntesis. Así, en presencia de una fuente externa de glicina betaína, el sistema Bet de *E. coli* se inhibe (Eshoo, 1988), promoviéndose así la captación de dicho compuesto sobre su síntesis a partir de colina.

Las permeasas osmorreguladas ProP y ProU median la captación de la mayoría de los osmoprotectores en *E. coli* y *S. typhimurium*. Originalmente fueron consideradas transportadores de prolina y más tarde se observó su implicación en el transporte de glicina betaína y otros osmoprotectores (Sleator y Hill, 2001).

El sistema ProP transporta glicina betaína, prolina y ectoína con afinidades semejantes (Jebbar *et al.*, 1992). Este sistema tiene una K_m de 44 μM y una V_{max} de 37 $\text{nmol min}^{-1} (\text{mg prot})^{-1}$ para el transporte de glicina betaína y se activa en respuesta a un choque osmótico en cuestión de segundos por una combinación de inducción transcripcional y estimulación de su actividad (Sleator y Hill, 2001). ProP es un transportador de un único componente con elevada homología a los transportadores de glicina betaína BetP de *C. glutamicum*, OpuD de *B. subtilis* y BetL de *L. monocytogenes*, así como a los sistemas de transporte de colina y carnitina, BetT y CaiT, respectivamente, de *E. coli* (Sleator y Hill, 2001). Todos ellos son miembros de la familia BCCT (“Betaine Carnitine Choline Transporters”) constituida por transportadores secundarios implicados en la captación de distintas moléculas, incluidos solutos compatibles, en diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. ProP es una proteína de 500 aminoácidos que se caracteriza por la presencia de una extensión C-terminal en forma de α -hélice con una importante función en la activación del sistema por estrés osmótico (Culham *et al.*, 2000). Un dominio similar en el transportador de glicina betaína BetP de *C. glutamicum* también está implicado en los mecanismos de detección y regulación del estrés osmótico y del estrés por frío durante la captación de glicina betaína por este organismo (Morbach y Krämer, 2005; Özcan *et al.*, 2005).

El segundo sistema implicado en la captación de glicina betaína en *E. coli* es ProU, un sistema de transporte de tipo ABC (Higgins, 1992). Los componentes de este sistema se encuentran codificados por los genes *proV*, *proW* y *proX*, que forman un operón. En la proteína periplásmica ProX, una caja aromática formada por tres residuos de triptófano proporciona una superficie negativamente cargada apropiada para acomodar el grupo trimetilamonio de la glicina betaína (Schiefner *et al.*, 2004). Como en el caso de ProP, la captación de glicina betaína a elevada osmolaridad es máxima debido a la inducción transcripcional del sistema (más de 100 veces) y a la estimulación de su actividad transportadora (Sleator y Hill, 2001). Sin embargo, a diferencia del sistema ProP, ProU transporta betaínas con una afinidad muy superior a la prolina y presenta valores de K_m y V_{max} en el transporte de glicina betaína de $1,3 \mu\text{M}$ y $12 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg prot})^{-1}$, respectivamente. Además, la activación de ProU por estrés hiperosmótico ocurre transcurridos varios minutos del choque osmótico (Faatz *et al.*, 1988).

3.4. Acumulación de prolina

La capacidad osmoprotectora de la prolina se observó ya en 1955 en *Salmonella* (Christian, 1955). Este compuesto se acumula a elevadas concentraciones en diversas bacterias tras su exposición a estrés osmótico. Muchas especies Gram-positivas sintetizan prolina tras un choque osmótico mientras que las bacterias Gram-negativas suelen acumularla mediante transporte (Csonka, 1988).

En la mayoría de las bacterias, la prolina se sintetiza a partir de glutamato en tres reacciones consecutivas catalizadas por la γ -glutamil quinasa (producto del gen *proB*), la γ -glutamil fosfato reductasa (producto del gen *proA*) y la Δ -1-pirrolina-5-carboxilato reductasa (producto del gen *proC*). Los genes *proB* y *proA* se suelen encontrar formando un operón mientras *proC* aparece en otra localización. El análisis de la secuencia genética de *B. subtilis* (Kunst *et al.*, 1997) ha revelado la presencia de un sistema alternativo de síntesis de prolina. Se trata del sistema aparentemente responsable de la acumulación de prolina en condiciones de estrés osmótico en esta bacteria (Bremer y Krämer, 2000). En esta ruta bioquímica alternativa, ProB y ProC son reemplazadas por las isoenzimas ProJ y ProH respectivamente.

3.4.1. Transporte de prolina

E. coli y *S. typhimurium* poseen tres sistemas de transporte de prolina: PutP, ProP y ProU (Wood, 1988). El sistema PutP actúa durante el transporte de prolina para su uso como fuente de carbono y nitrógeno y, por tanto, tiene un efecto mínimo en osmoadaptación. A pesar de que los homólogos de PutP son estructuralmente similares, la regulación de los correspondientes genes varía entre las distintas especies bacterianas. Los genes *putP* de *E. coli* y *C. glutamicum* no se encuentran regulados osmóticamente (Grothe *et al.*, 1986; Peter *et al.*, 1997). Sin embargo, los genes *putP* de *Staphylococcus aureus* y *V. vulnificus* se activan en ambientes con una baja concentración de prolina y elevada osmolaridad (Lee *et al.*, 2003; Schwan *et al.*, 2006), mientras que *opuE* (el homólogo a *putP* en *B. subtilis*) se induce fuertemente en respuesta a un choque osmótico y sin embargo no responde a prolina (Spiegelhalter y Bremer, 1998).

Los sistemas osmóticamente inducibles ProP y ProU responden significativamente a un choque hiperosmótico y de ellos, ProP es el que contribuye en mayor medida a la osmoprotección debida a la captación de prolina (Csonka, 1982).

3.5. Acumulación de trehalosa

La trehalosa (1-O- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor que puede encontrarse en muchos organismos, incluyendo bacterias, levaduras, hongos, plantas, invertebrados y mamíferos.

Se han propuesto numerosas funciones para la trehalosa que dependen del sistema biológico analizado. En organismos procarióticos los carbohidratos pueden utilizarse como fuentes de carbono, o ser almacenados como solutos compatibles (Argüelles, 2000). En las bacterias de los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Corynebacterium*, la trehalosa está presente en los glucolípidos de la pared celular (Richards *et al.*, 2002). En levaduras y hongos filamentosos se almacenan grandes cantidades de trehalosa como reserva de carbohidratos y como protector frente a estreses ambientales. También se ha observado que en levaduras, la trehalosa-6-fosfato (un intermediario en la biosíntesis de trehalosa) es un regulador del flujo metabólico de

la glucosa durante la glucólisis (Gancedo y Flores, 2004). En las llamadas “plantas resurrección”, como *Selaginella lepidophylla* y *Myrothammus flabellifolius*, la trehalosa es una molécula esencial en la protección frente a estrés, especialmente durante la sequía. Sin embargo, en *Arabidopsis thaliana* dicho compuesto es fundamental durante el desarrollo embrionario y en la señalización por ácido abscísico y azúcares (Eastmond *et al.*, 2002; Avonce *et al.*, 2004).

El éxito de esta molécula en la naturaleza se explica por sus propiedades químicas y físicas, incluidos un alto grado de estabilidad química, su hidrofilia, la carencia de puentes de hidrógeno intramoleculares y su capacidad para formar cristales no higroscópicos (Crowe *et al.*, 1998). Todas estas características la convierten en un osmolito especialmente adecuado durante la adaptación a distintos tipos de estrés. El carácter protector de la trehalosa frente a diversas condiciones de estrés, incluidas salinidad, desecación, congelación y altas o bajas temperaturas, ha sido ampliamente demostrado en hongos, levaduras y bacterias (Cánovas *et al.*, 2001; Welsh, 2000). Además, la inducción de la síntesis de trehalosa por un estrés proporciona tolerancia a las células frente a otros tipos de estrés, lo que indica que la acumulación de este compuesto es un factor crucial en las respuestas frente a distintas condiciones adversas.

De modo semejante, la función de la síntesis de trehalosa en la tolerancia a estrés se confirma en estudios *in vitro* que han mostrado que la trehalosa puede proteger enzimas aisladas, anticuerpos y membranas frente al estrés por desecación, temperaturas extremas y concentraciones inhibitorias de algunas especies químicas (Welsh, 2000). Así, la trehalosa aumenta la estabilidad de varios productos inestables como enzimas, alimentos, medicamentos y cosméticos durante su desecación o su congelación y, en consecuencia, se ha convertido en un conservante muy utilizado.

3.5.1. Síntesis de trehalosa

Se ha observado que la trehalosa es un soluto osmorregulado en bacterias fototróficas y se acumula en muchos organismos como respuesta a diversos tipos de estrés. *E. coli* y *S. typhimurium* la acumulan mediante síntesis *de novo* como el soluto compatible endógeno predominante en ausencia de solutos compatibles exógenos (Strøm y Kaasen, 1993).

Se han descrito cinco rutas biosintéticas de trehalosa:

a) La primera se descubrió hace casi 50 años (Cabib y Lenoir, 1958) y es la más ampliamente distribuida. Se ha descrito en eubacterias, arqueas, levaduras, hongos, insectos y plantas (Avonce *et al.*, 2006). Consta de dos reacciones catalizadas por la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) y la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP) (Fig. I6). La TPS cataliza la condensación enzimática de los precursores glucosa-6-fosfato y UDP-glucosa para formar trehalosa-6-fosfato, y la trehalosa libre es generada a continuación por la TPP (Elbein *et al.*, 2003; De Smet *et al.*, 2000).

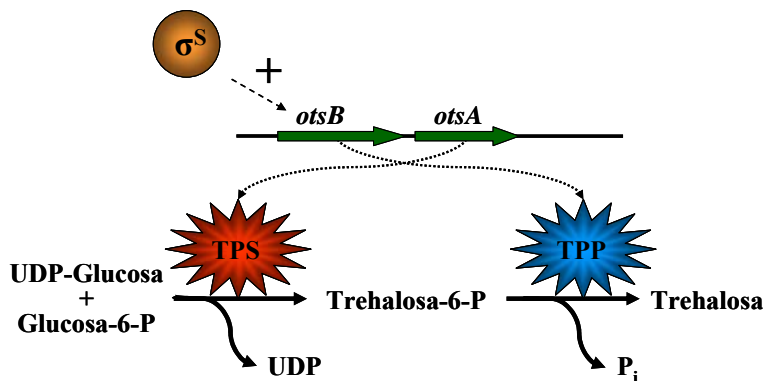


Figura I6.- Representación esquemática de la síntesis de trehalosa por la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) y la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP).

Los genes que codifican estas enzimas se identificaron originalmente en *E. coli* y se denominaron *otsA* y *otsB* (“*osmoregulated trehalose synthesis*”) ya que estaban implicados en osmorregulación. La transcripción del operón *otsBA* está bajo el control de *rpoS*, un factor sigma de la ARN polimerasa implicado en la expresión de genes durante la fase estacionaria (Hengge-Aronis *et al.*, 1991; Strøm y Kaasen, 1993). Sin embargo, también puede conducir a la acumulación de trehalosa cuando la célula se

somete a un estrés capaz de causar una disminución de la tasa de crecimiento. Además, es probable que se ejerza un control alostérico sobre la actividad de alguna de las enzimas implicadas en la síntesis de trehalosa puesto que Giæver y colaboradores (1988) comprobaron que un mutante de *E. coli* que expresaba constitutivamente la trehalosa-6-fosfato sintasa, sólo acumulaba trehalosa en medios de elevada osmolaridad.

b) En la segunda ruta biosintética, la trehalosa sintasa (TS), codificada por el gen *treS*, isomeriza el enlace $\alpha 1,4$ de una maltosa a $\alpha 1,1$, dando lugar a trehalosa (Elbein *et al.*, 2003; Higashiyama, 2002) (Fig. I7). Esta enzima se descubrió en *Pimelobacter* sp. R48 (Tsusaki *et al.*, 1996) y *Thermus aquaticus* (Tsusaki *et al.*, 1997) y se han encontrado ortólogos en otros microorganismos como *Mycobacterium* (De Smet *et al.*, 2000), aunque parece ser exclusiva de eubacterias.

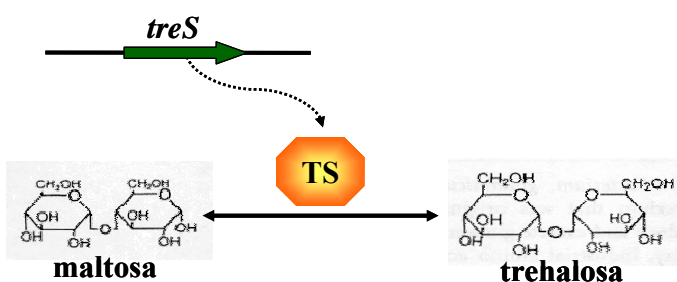


Figura I7.- Representación esquemática de la síntesis de trehalosa mediante la trehalosa sintasa (TS).

c) En la tercera ruta, la trehalosa se sintetiza a partir de oligo o polimaltodextrinas (maltooligosacáridos, glucógeno y almidón). Esta ruta se descubrió en arqueas termófilas del género *Sulfolobus* y consta de dos reacciones (Fig. I8). La primera está catalizada por la maltooligosil trehalosa sintasa (MOTS), codificada por el gen *treY*, que transglicosila el último enlace del extremo reducido de la cadena de una conformación $\alpha 1,4$ a $\alpha 1,1$ para formar maltooligosiltrehalosa. A continuación, la maltooligosil trehalosa trehalohidrolasa (MOTTH), codificada por el gen *treZ*, cataliza la liberación mediante hidrólisis de la trehalosa terminal (Elbein *et al.*, 2003; Streeter y Bhagwat, 1999).

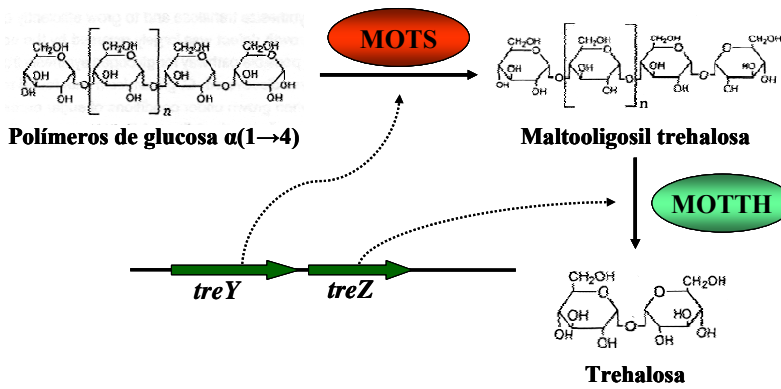


Figura 18.- Representación esquemática de la síntesis de trehalosa mediante la maltooligosil trehalosa sintasa (MOTS) y la maltooligosil trehalohidrolasa (MOTTH).

Esta ruta se ha identificado en *Rhizobium*, *Arthrobacter* y varias especies de *Sulfolobus* y *Mycobacterium* (Kobayashi *et al.*, 1996; Maruta *et al.*, 1996a; b; De Smet *et al.*, 2000). También se ha visto que en *C. glutamicum*, la síntesis osmorregulada de trehalosa está mediada por este sistema y no por la ruta TPS/TPP, aunque se observa una inducción de los genes *otsA* y *treS* tras un choque hiperosmótico (Wolf *et al.*, 2003).

d) En la cuarta ruta, la trehalosa fosforilasa (TreP), presente en algunos hongos, cataliza la hidrólisis reversible de trehalosa en presencia de fosfato inorgánico (Fig. 19). La transferencia de una molécula de glucosa a un fosfato genera glucosa-1-fosfato y libera el otro residuo de glucosa. Esta reacción es reversible *in vitro*, aunque *in vivo* parece transcurrir preferentemente hacia la degradación de la trehalosa, por lo que la participación de TreP en su síntesis no está clara (Wannet *et al.*, 1998; Schiraldi *et al.*, 2002).

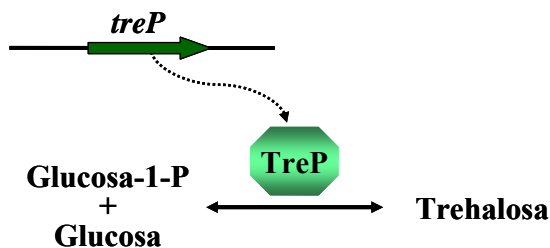


Figura 19.- Representación esquemática de la síntesis de trehalosa por la trehalosa fosforilasa (TreP).

e) Una nueva ruta biosintética ha sido descubierta en la arquea hipertermófila *Thermococcus litoralis*. Esta ruta implica a la trehalosa glucosiltransferasa sintasa (TreT) que cataliza la formación reversible de trehalosa a partir de ADP-glucosa y glucosa (Qu *et al.*, 2004; Ryu *et al.*, 2005) (Fig. I10). También puede utilizar UDP-glucosa o GDP-glucosa aunque con menor eficiencia.

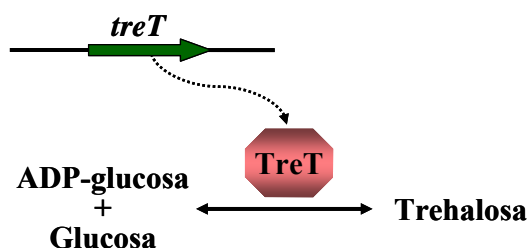


Figura I10.- Representación esquemática de la síntesis de trehalosa por la trehalosa glucosiltransferasa (TreT).

Las eubacterias son el único grupo de organismos en el que hay representantes de las cinco rutas descritas, aunque no en la misma especie. La mayoría de las bacterias presentan una única ruta de síntesis de trehalosa (habitualmente la TPS/TPP) aunque se han identificado hasta tres rutas distintas en algunas bacterias como *C. glutamicum* (Wolf *et al.*, 2003) o *Bradyrhizobium japonicum* (Streeter y Gómez, 2006). La presencia de varias rutas de biosíntesis de trehalosa en el mismo organismo puede deberse a requerimientos estrictos para la acumulación de trehalosa en condiciones ambientales variables, que pueden limitar la disponibilidad de sustrato de alguna de las rutas. Además, varias especies de eubacterias cuyos genomas han sido secuenciados parecen presentar más de una copia de alguna de estas rutas. Por ejemplo, *Mesorhizobium loti*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas campestris* tienen dos genes homólogos a *otsA* y *Thermoanaerobacter tengcongensis* presenta dos genes *treP* (Avonce *et al.*, 2006).

Es interesante señalar que la ruta de la trehalosa sintasa (TS) sólo está presente en eubacterias, mientras que TreT aparece sólo en arqueas y en *Thermotoga maritima*, una eubacteria termófila que ha adquirido buena parte de su genoma de arqueas mediante transferencia genética horizontal (Worning *et al.*, 2000). En hongos, plantas e invertebrados sólo se encuentra la ruta TPS/TPP y no aparecen homólogos con ningún

otro sistema de síntesis de trehalosa. Además, ninguna de las cinco rutas descritas aparece en vertebrados aunque sí se ha encontrado la enzima catabólica TreH (trehalasa).

3.5.2. Utilización de la trehalosa

Diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas utilizan la trehalosa exógena como fuente de carbono y energía. El sistema genético para la utilización de la trehalosa está bien caracterizado en *E. coli*, donde puede actuar simultáneamente como fuente de carbono y como soluto compatible en ambientes de alta osmolaridad (Horlacher y Boos, 1997).

En condiciones de baja osmolaridad, la captación de trehalosa se realiza a través de un sistema fosfotransferasa específico (TreB), que transporta este disacárido como trehalosa-6-fosfato hasta el citoplasma, donde es hidrolizado por la trehalosa-6-fosfato hidrolasa citoplasmática (TreC) produciendo glucosa y glucosa-6-fosfato que pueden utilizarse a continuación como sustratos para la glucólisis (Rimmele y Boos, 1994). Cuando la osmolaridad del medio aumenta, se induce la síntesis de trehalosa en *E. coli* tal y como hemos descrito en el apartado anterior. La trehalosa-6-fosfato fosfatasa hidroliza eficientemente la trehalosa-6-fosfato eliminando del medio este inductor del operón catabólico *treBC* en condiciones en las que la trehalosa se acumula en la célula como soluto compatible (Horlacher *et al.*, 1996).

Sin embargo, sólo la trehalosa sintetizada endógenamente tiene una función osmoprotectora ya que a elevada osmolaridad, la trehalosa exógena se degrada en dos moléculas de glucosa por la trehalasa periplásmica TreA, que también se induce en respuesta a estrés osmótico y permite la utilización de la trehalosa como fuente de carbono incluso en condiciones de elevada osmolaridad. La glucosa que se libera es entonces transportada por el sistema fosfotransferasa específico para glucosa. La utilización de la trehalosa como soluto compatible y como fuente de carbono de modo simultáneo es posible gracias a la separación espacial de las correspondientes rutas de síntesis y degradación: las enzimas implicadas en la biosíntesis de trehalosa se localizan en el citoplasma mientras que su degradación tiene lugar en el periplasma (Boos *et al.*,

1990; Horlacher y Boos, 1997). Además, es necesario que estos procesos estén estrictamente controlados y asociados con la osmolaridad del ambiente para evitar la aparición de ciclos fútiles.

3.6. Cambios en las envolturas celulares

El citoplasma de una bacteria que emplea solutos compatibles queda protegido del daño que puede provocar la presencia de sal en el medio externo. Sin embargo, la superficie externa de la membrana citoplasmática, así como el espacio periplásmico y la membrana externa en Gram-negativas, se encuentran permanentemente expuestos al estrés y varían su composición para adaptarse a éste. Una de las estrategias más evidentes de adaptación de la membrana citoplasmática es el aumento de la proporción de fosfolípidos aniónicos respecto a los anfipáticos. Esta modificación estructural aumenta la carga de la membrana de modo semejante a lo que ocurre con las enzimas halófilas. El exceso de carga negativa ayuda al mantenimiento de la hidratación en la interfase y tiene un importante efecto en el comportamiento de la fase lipídica (Russell *et al.*, 1995; Sutton *et al.*, 1991).

Los genes osmorregulados más estudiados, que no contribuyen directamente a la acumulación de solutos compatibles, codifican las porinas de membrana externa OmpC y OmpF. Estas proteínas constituyen dos canales de membrana externa estructuralmente relacionados, que actúan facilitando la difusión no específica de pequeñas moléculas hidrofílicas (≤ 500 Da) a través de la membrana externa (Nikaido, 2003). Su expresión responde de un modo recíproco a la osmolaridad del medio ya que *ompF* se reprime ante un aumento de la osmolaridad mientras *ompC* se induce (Csonka, 1989). Los niveles de OmpC y OmpF responden no sólo al estrés osmótico sino a cambios en una amplia variedad de parámetros ambientales, como temperatura, pH y disponibilidad de oxígeno y fuentes de carbono (Csonka y Hanson, 1991).

Por último, el espacio periplásmico de las bacterias Gram-negativas contiene polisacáridos altamente aniónicos que en *E. coli* se denominan MDOs (Kennedy, 1987). La síntesis de estos polisacáridos está codificada por los genes de expresión constitutiva *mdoA* y *mdoB*. Estos polímeros aniónicos (contienen entre seis y doce unidades de

glucosa con una carga promedio de -5; Kennedy, 1982) generan un potencial de Donnan a través de la membrana externa que provoca la acumulación de cationes en el periplasma llegando a concentraciones superiores a las del medio, por lo que se produce un incremento de la presión hidrostática en el espacio periplásmico (Kennedy, 1982). Al contrario que los solutos compatibles, los niveles de MDOs disminuyen al aumentar la osmolaridad (Miller *et al.*, 1986). A pesar de la aparente importancia de estos compuestos en la osmorregulación del periplasma de bacterias Gram-negativas, el crecimiento de *E. coli* no se ve afectado en medios con alta o baja osmolaridad cuando se bloquea su síntesis (Kennedy, 1982; Fiedler y Roterling, 1988).

II.- SIMBIOSIS *Rhizobium*-LEGUMINOSA

El nitrógeno es el elemento más abundante en la atmósfera terrestre y sin embargo es una fuente nutritiva muy escasa y constituye, después del agua, el principal limitante de la producción agrícola. Esta paradoja se debe a que el nitrógeno atmosférico se halla en forma de gas o dinitrógeno (N_2) que la mayoría de los seres vivos no pueden utilizar directamente. La forma nitrogenada utilizada comúnmente por las plantas y por casi todos los microorganismos es el nitrógeno combinado inorgánico, y la conversión del nitrógeno molecular a formas de nitrógeno asimilables por los seres vivos, como amonio o nitratos, se denomina fijación del nitrógeno.

Se estima que en total se fijan aproximadamente 275 millones de toneladas métricas (Tm) de nitrógeno al año, de los que 30 se deben a causas naturales como descargas eléctricas o erupciones volcánicas, 70 proceden de la fijación industrial por el proceso Haber-Bosch, y 175 de la fijación biológica.

La reacción Haber-Bosch se utiliza para la producción de fertilizantes nitrogenados necesarios para completar el elevado requerimiento de nitrógeno asimilable de los cultivos. En este proceso, el nitrógeno molecular es reducido a amoníaco por hidrógeno a elevadas temperaturas ($500^{\circ}C$) y presiones (350 atm.). El uso de fertilizantes conlleva un gasto considerable, debido a que su producción requiere la utilización de

combustibles fósiles. Además, constituye un riesgo potencial de contaminación y eutrofización de las aguas dulces por lixiviación del nitrógeno de los suelos. Por ello, la fijación biológica de nitrógeno constituye una alternativa de gran interés económico y ecológico (Aparicio-Tejo *et al.*, 2000).

La fijación biológica de nitrógeno es llevada a cabo exclusivamente por procariotas. El grupo de procariotas capaz de realizar este proceso es grande y diverso y contiene tanto eubacterias como arqueas (Widmer *et al.*, 1999; Zehr *et al.*, 2003). De los 175 millones de Tm de nitrógeno fijados anualmente por vía biológica, 35 proceden de la fijación en vida libre y 140 de la fijación simbiótica.

Las principales responsables de la fijación simbiótica de nitrógeno son las bacterias conocidas genéricamente como rizobios. Dichas bacterias constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos distribuidos en 12 géneros: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Blastobacter*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Burkholderia*, *Ralstonia* y *Ochrobactrum*. Aunque el género *Sinorhizobium* se ha reclasificado bajo el nombre de *Ensifer*, hemos preferido mantener la nomenclatura tradicional debido a su predominancia en la bibliografía.

Los rizobios son bacilos aerobios Gram-negativos, móviles y no esporulados. Se encuentran presentes en el suelo y son capaces de establecer una relación simbiótica con plantas de la familia Fabaceae, la tercera familia en número de especies de las Angiospermas y la segunda en importancia económica para el hombre, por detrás de las gramíneas. Las bacterias se localizan en el interior de órganos especializados llamados nódulos que aparecen generalmente en las raíces de la planta. Dentro de estos órganos y tras su diferenciación en bacteroides, fijan nitrógeno atmosférico reduciéndolo a amonio. La asociación simbiótica entre los dos organismos, planta y bacteria, supone una complementación nutricional recíproca. La planta recibe una fuente de nitrógeno, por lo general el nutriente limitante para su crecimiento, mientras la bacteria dispone de una fuente de carbono y un nicho ecológico en el que alcanza altas tasas de crecimiento.

1. SIMBIOSIS *Rhizobium*-LEGUMINOSA

Beijerinck, en 1888, obtuvo el primer cultivo bacteriano puro de un nódulo de leguminosa y lo llamó *Bacillus radicicola*. Un año más tarde Frank definió el género *Rhizobium* con una única especie, *R. leguminosarum*. Al principio, se consideró que la misma bacteria nodulaba todas las leguminosas y pasaron bastantes años antes de que se llevaran a cabo los primeros trabajos dirigidos a estudiar la diversidad de los microorganismos denominados genéricamente rizobios, los cuales tuvieron como consecuencia la definición de numerosas especies dentro de la familia *Rhizobiaceae*. Existen bacterias de otras familias capaces de inducir la formación de nódulos en plantas leguminosas. Por ejemplo, una cepa de *Methylobacterium* (una α -proteobacteria) puede nodular *Crotalaria* y algunas β -proteobacterias relacionadas con *Burkholderia* pueden nodular *Machaerium lunatum* y *Aspalathus carnosa* (Moulin *et al.*, 2001; Sharma y Signer, 1990). Aparentemente todas estas especies han adquirido mediante transferencia genética horizontal los genes usados por rizobios típicos para inducir la formación del nódulo y catalizar la fijación de nitrógeno.

La capacidad de las plantas para establecer simbiosis con estas bacterias es exclusiva de las leguminosas, con una excepción: diversas especies de *Parasponia*, un género que pertenece a la familia Ulmaceae, establecen simbiosis con bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Aproximadamente el 90% de las especies de leguminosas catalogadas forma nódulos fijadores de nitrógeno. La formación de nódulos simbióticos requiere el intercambio de una serie de señales entre la bacteria y la planta hospedadora. Se produce así un verdadero diálogo molecular entre ambos organismos que determina el establecimiento de nuevos patrones morfogénéticos en la planta y en la bacteria. Como resultado de la interacción, se producen simultáneamente los procesos de infección y de organogénesis del nódulo, que desembocan en la formación del nódulo maduro, donde los rizobios, una vez diferenciados, llevan a cabo la fijación simbiótica del nitrógeno (revisado por Jones *et al.*, 2007).

Una de las características principales de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es su especificidad: cada especie de rizobio es capaz de establecer relaciones simbióticas sólo

con ciertas especies de leguminosas, sus hospedadores específicos, y no con otras. La compatibilidad entre dos socios para establecer una simbiosis activa viene determinada por el reconocimiento mutuo. El intercambio de señales químicas entre ambos organismos es responsable de dicho reconocimiento, determinando en cada paso de la interacción la inducción recíproca de programas genéticos específicos, tanto en la planta hospedadora como en la bacteria. El rango de hospedador varía considerablemente entre los distintos rizobios. Así, por ejemplo, *Rhizobium* sp. NGR234 es capaz de nodular más de cien géneros distintos de leguminosas y la no leguminosa *Parasponia*, mientras que otros rizobios tienen un rango de hospedador mucho más reducido, discriminando incluso entre genotipos dentro de una misma especie de leguminosa.

El estudio de la interacción simbiótica entre estos organismos tiene así una importancia fundamental, no sólo por su repercusión económica y ecológica, sino también porque representa un modelo de investigación básico para profundizar en el conocimiento de procesos de regulación génica, reconocimiento interespecífico, y desarrollo, propios de la biología vegetal y microbiana.

2. PROCESO DE NODULACIÓN

Para comenzar una simbiosis productiva, los rizobios deben reconocer y responder a la presencia de las raíces de las plantas hospedadoras. Durante el crecimiento en la rizosfera de una planta hospedadora, los rizobios detectan la presencia de compuestos como los flavonoides secretados por las raíces de la planta y responden induciendo los genes de nodulación (Cassab, 1998; Cosgrove *et al.*, 1997; Cosgrove *et al.*, 2002). La composición de la mezcla de flavonoides varía con la especie de la planta, su estado fisiológico y su estado de desarrollo. El papel de estas sustancias en la inducción o inhibición de la expresión de genes bacterianos implicados en la nodulación (genes *nod*, *nol* y *noe*) constituye el primer determinante de especificidad en la interacción, aunque no el más importante.

Los genes *nod* codifican aproximadamente 25 proteínas necesarias para la síntesis y exportación del factor Nod. El factor Nod es una molécula señal de tipo lipoquitooligosacárido que consiste en un esqueleto de entre tres y seis unidades de N-acetil glucosamina (quitina) en el que la glucosamina del extremo no reductor está esterificada con un ácido graso. Esta estructura básica presenta una serie de modificaciones, denominadas decoraciones, de distinta naturaleza que varían entre los diferentes rizobios, consistentes en la aparición de sustituyentes en el citoesqueleto oligosacárido así como variaciones en la longitud y el grado de saturación del ácido graso. Cada especie o estirpe bacteriana produce generalmente varios tipos de factores Nod, que son reconocidos específicamente por los hospedadores compatibles de dicha bacteria. De esta forma, la producción de factores Nod por la bacteria resulta ser el mayor determinante de especificidad en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, definiendo el rango de hospedadores susceptibles de ser infectados por una cierta estirpe o especie de rizobio (Perret *et al.*, 2000). El factor Nod provoca muchos de los cambios en el desarrollo que se observan en la planta hospedadora al comienzo del proceso de nodulación. En algunos casos se ha podido inducir la formación de primordios nodulares en plantas crecidas en ausencia de microorganismos con sólo añadir estos compuestos a muy bajas concentraciones (Lerouge *et al.*, 1990).

Una de las primeras fases del reconocimiento entre la bacteria y la leguminosa es la unión del microorganismo a los pelos radicales de la planta. Una vez que los rizobios se han unido a los pelos radicales, se induce un cambio en la dirección de su crecimiento apical. En las leguminosas típicas, los rizobios penetran a través de la pared celular del pelo radical, quedando envueltos en una estructura tubular, conocida como cordón de infección, que progresa hacia la base del pelo radical. Este cordón de infección contiene una matriz de origen bacteriano y glicoproteína de origen vegetal. Simultáneamente, y en respuesta a los factores Nod, ciertas células del córtex en posición opuesta a los polos del protoxilema entran de nuevo en el ciclo celular y se dividen proliferando activamente y originando el primordio nodular (revisado por Gage, 2004).

El crecimiento dirigido de los cordones de infección transporta los rizobios hasta las células del primordio nodular. Allí, los cordones de infección se ramifican y

mientras continúa el desarrollo del nódulo, se produce la liberación de las bacterias en el citoplasma de las células vegetales. La liberación de las bacterias es un proceso similar a la endocitosis, quedando así las bacterias confinadas en una vesícula denominada simbiosoma. Finalmente, se produce la diferenciación de las bacterias en formas especializadas en la fijación del dinitrógeno atmosférico llamadas bacteroides. Esta diferenciación suele estar acompañada de un aumento del volumen de la bacteria, así como de un cambio de su morfología de bacilo corto a formas más o menos distorsionadas.

Los nódulos inducidos por los rizobios se clasifican generalmente en determinados e indeterminados. La organización general de los nódulos simbióticos es básicamente la misma, ya que tanto los nódulos determinados como los indeterminados presentan un tejido central, donde se produce la fijación simbiótica de nitrógeno, con células infectadas y no infectadas, rodeado de un tejido periférico que consta de un córtex externo, una endodermis y un parénquima o córtex interno. El tejido central del nódulo es, sin embargo, muy diferente según se trate de un nódulo determinado o indeterminado.

Los nódulos determinados se originan a partir de división de células del córtex externo. Las divisiones celulares en la región central del nódulo cesan pronto y el aumento del tamaño nodular se produce por crecimiento de las células ya existentes, lo que determina su forma esférica. La diferenciación de las células infectadas tiene lugar de modo sincrónico y el nódulo maduro contiene células simbióticas con una población homogénea de bacteroides fijadores de nitrógeno (Franssen *et al.*, 1992). En contraste con esta situación, los nódulos de tipo indeterminado se originan a partir de divisiones de células del córtex interno y tienen una forma alargada debido a la presencia de un meristemo persistente. Puesto que el tamaño del meristemo es constante, la actividad de división celular y la producción de nuevas células meristemáticas se encuentra equilibrada con la salida del mismo número de células del ciclo mitótico. Este proceso provoca un gradiente de etapas de desarrollo en el nódulo, desde el meristemo en el extremo apical hasta el tejido senescente cercano a la raíz (Vasse *et al.*, 1990).

III.- SALINIDAD Y FIJACIÓN SIMBIÓTICA DE NITRÓGENO

La mayoría de los cultivos de interés agrícola son sensibles a concentraciones relativamente bajas de sales en el suelo. El área de suelo afectada por salinidad secundaria, es decir, salinidad causada por la actividad humana, se incrementa gradualmente. Las estimaciones más recientes consideran que hay más de 70 millones de hectáreas de suelo agrícola afectado (FAO, 2005). La salinidad es una seria amenaza para la agricultura en regiones áridas y semiáridas. La infertilidad del suelo en estas áreas es a menudo debida a la presencia de grandes cantidades de sal y la irrigación de los cultivos con agua de alto contenido iónico agrava aun más esta situación.

En el caso de las leguminosas el efecto de la salinidad es más grave cuando su nutrición nitrogenada depende de la simbiosis (Zhou *et al.*, 1992), ya que, además de la planta, la bacteria es sensible a la salinidad tanto en su forma libre como en el estado simbiótico. Además, la concentración de sal que inhibe la simbiosis *Rhizobium-leguminosa* puede ser menor que la que inhibe el crecimiento de los simbiontes individualmente, como ocurre en la simbiosis *S. meliloti-Medicago sativa* (Bordeleau y Prévost, 1994). Las evidencias sugieren que la mejora de la fijación simbiótica de nitrógeno en condiciones de salinidad precisa que ambos organismos implicados, junto con las distintas etapas de su interacción (interacciones tempranas, formación del nódulo, actividad, etc.), sean tolerantes a este estrés (Bouhmouch *et al.*, 2005). Así pues, resulta de gran importancia conocer los mecanismos de adaptación de ambos simbiontes a estrés osmótico, por cuanto ello puede conducir al diseño de estrategias de mejora de la eficiencia de la simbiosis en condiciones adversas y, en consecuencia, a la mejora del crecimiento de la planta.

Entre los efectos de la alta concentración salina sobre la simbiosis se puede destacar la disminución del número de rizobios que colonizan la raíz (Tu, 1981), la inhibición de las primeras etapas del proceso de infección (Zahran y Sprent, 1986), la reducción de la actividad nitrogenasa (Baker *et al.*, 1995; Shamseldin y Werner, 2005), la disminución del peso y número de nódulos (Elsheikh y Wood, 1990; Cordovilla *et al.*, 1994) y la afectación de las paredes celulares y la membrana peribacteroidal (Bolaños *et al.*, 2003).

Sin embargo, los distintos rangos de tolerancia a NaCl y los diferentes mecanismos de adaptación que utilizan las leguminosas hacen que las respuestas sean difíciles de comparar. Así, mientras que en plantas de soja sometidas a estrés salino se producen cambios estructurales en la barrera de difusión del oxígeno, que limitan la disponibilidad de éste para la respiración nodular (Serraj *et al.*, 1995), en *Lupinus albus*, planta más tolerante, estos cambios no se observan (Fernández-Pascual *et al.*, 1996).

Una de las respuestas más importantes y generalizadas de todos los organismos sometidos a estrés salino es la acumulación de solutos compatibles en el citoplasma. En los nódulos de haba, lupino, guisante y alfalfa, la concentración de prolina, glicina betaína y azúcares solubles se incrementa notablemente cuando las plantas se someten a condiciones de estrés osmótico (Fougère *et al.*, 1991; Delgado *et al.*, 1993; Cordovilla *et al.*, 1996; Fernández-Pascual *et al.*, 1996). Otra respuesta general a altas concentraciones de NaCl en muchas glicofitas es la exclusión de iones sodio y cloro, especialmente en los tejidos foliares, y la acumulación de potasio (Greenway y Munns, 1980). En nódulos de *L. luteus*, que presentan una relativa halotolerancia, parece darse este tipo de mecanismo, excluyendo el sodio y el cloro de la zona central del córtex (Fernández-Pascual *et al.*, 1996).

En el caso de los rizobios, el problema es más complejo. La bacteria en forma libre debe responder a los cambios en el potencial osmótico de su entorno y además debe adaptarse a nuevas situaciones osmóticas durante el proceso de infección y en el interior del nódulo (Botsford y Lewis, 1990). Para comenzar una relación endosimbiótica, la bacteria debe ser capaz de sobrevivir en la rizosfera y colonizar las raíces de la planta hospedadora. La rizosfera se define como el volumen de suelo que rodea la raíz de una

planta y está influenciado por los compuestos que ésta exuda (Bowen y Rovira, 1976). Además de la exudación de compuestos a la rizosfera, la planta también influye el ambiente de la rizosfera eliminando activamente nutrientes como agua y otros elementos traza que son esenciales para su propia supervivencia, y excluyendo otros como el sodio que le resultan perjudiciales. Se ha sugerido que esta exclusión puede tener como consecuencia la salinización de la rizosfera por lo que la osmolaridad en esta zona es probablemente superior a la del suelo circundante (Miller y Wood, 1996).

Se cree que las bacterias en los cordones de infección hacen frente a un estrés oxidativo (Santos *et al.*, 2000) y osmótico (Jensen *et al.*, 2005). Además, diversos datos sugieren que el medio en el que funciona el bacteroide fijador de nitrógeno es un microambiente hostil (Nogales *et al.*, 2002; Sarma y Emerich, 2005; Santos *et al.*, 2000). Desde esta perspectiva, la diferenciación de bacteria a bacteroide podría ser vista como una forma de adaptación a un microambiente estresante, esto es, como una forma de supervivencia en un medio adverso tras su endocitosis por las células del nódulo. Por tanto, la expresión de los factores genéticos que gobiernan dicho proceso de diferenciación celular debe coordinarse bajo tales condiciones de estrés.

Se han identificado distintos genes relacionados con la adaptación de la bacteria a cambios ambientales que están también implicados en el normal desarrollo de la simbiosis. Éste es, por ejemplo, el caso de los genes *bacA* (Ichige y Walker, 1997) y *typA* de *S. meliloti* (Kiss *et al.*, 2004). La incapacidad bacteriana para tolerar el estrés oxidativo, ocasionada por ejemplo en mutantes carentes de SodA, conduce a importantes defectos simbióticos en *S. meliloti*, como la detención de la diferenciación en bacteroides (Santos *et al.*, 2000). Las modificaciones de la superficie de la célula bacteriana durante su liberación en el interior de las células vegetales también se consideran una respuesta adaptativa ante los cambios ambientales que las bacterias experimentan (Brewin, 1998).

Estudios previos sobre la capacidad de cepas rizobianas para crecer en presencia de sales han mostrado marcadas variaciones en su tolerancia a estrés osmótico. Se cree que normalmente los rizobios de crecimiento rápido son más tolerantes a salinidad (Keyser *et al.*, 1982) y muchos trabajos señalan que las cepas tolerantes a salinidad son más eficientes que las no tolerantes en condiciones estresantes. Una de las mayores críticas que se hace a este tipo de trabajos es que no utilizan cepas isogénicas por lo que las variaciones en la eficiencia simbiótica pueden reflejar variaciones genotípicas no relacionadas con la tolerancia a sal (Zahran, 1999). Sin embargo, cuando se seleccionaron mutantes de *R. tropici* o *S. meliloti* sensibles a condiciones hiperosmóticas, la mayoría resultaron estar afectados en el desarrollo normal de la simbiosis (Nogales *et al.*, 2002; Miller-Williams *et al.*, 2006). Estos datos sugieren que los rizobios necesitan una serie de genes para su adaptación a estrés osmótico en vida libre, y que esos mismos genes son necesarios para el normal funcionamiento de la bacteria durante la simbiosis.

Además, se ha observado que los nódulos de plantas de alfalfa sometidas a estrés osmótico presentan importantes modificaciones ultraestructurales y cambios bioquímicos significativos (Fougère *et al.*, 1991; Trinchant *et al.*, 2004). En estos nódulos, el espacio peribacteroidal se encuentra aumentado, lo que sugiere un aumento de la presión de turgor en el interior del simbiosoma que podría ser debido a una elevada concentración de solutos compatibles. La salinización de las plantas aumenta fuertemente la concentración de algunos metabolitos como la asparragina, el lactato y el pinitol en los bacteroides. En conjunto, estos datos apoyan la idea de que los bacteroides pueden responder a las variaciones en las condiciones osmóticas a las que se enfrenta la planta, y adaptar su presión de turgor mediante modificaciones en sus actividades de transporte o síntesis *de novo* de solutos compatibles.

1. OSMOADAPTACIÓN EN RIZOBIOS

Las respuestas osmoadaptativas de las especies de rizobios no se conocen aún con detalle. No obstante, parecen utilizar los mismos solutos compatibles y osmoprotectores que las bacterias entéricas durante su osmoadaptación, aunque de modo un tanto particular. La mayoría de los estudios se han realizado en diversas estirpes de *S. meliloti* y hay que destacar que las respuestas de esta especie no se pueden generalizar a otros rizobios. De hecho, distintas estirpes de *S. meliloti* se comportan de manera diferente frente a las mismas condiciones medioambientales (Botsford, 1984).

1.1. Acumulación de potasio y glutamato

La primera fase de la respuesta de *Rhizobium* al aumento de la concentración de NaCl en el medio externo se caracteriza por la elevación del contenido de potasio y glutamato en el interior celular (Botsford, 1984; Yap y Lim, 1983). El aumento del contenido de potasio, común en muchas eubacterias, puede ser la señal reguladora que actúe como segundo mensajero y desencadene gran parte de las respuestas posteriores frente al estrés osmótico (Csonka y Hanson, 1991). Sin embargo, sólo en un caso se ha establecido la implicación de un posible transportador de potasio (Kup) en la adaptación a estrés osmótico de un rizobio (Nogales *et al.*, 2002).

Diversos autores observaron un incremento en la actividad de las enzimas implicadas en la ruta de síntesis del glutamato durante la exposición a estrés salino, lo que provocaba una significativa acumulación de este aminoácido. Cuando las condiciones de baja osmolaridad se restablecían, *Rhizobium* era capaz de utilizar fácilmente el glutamato como fuente de carbono y nitrógeno (Botsford y Lewis, 1990).

La recuperación del equilibrio iónico tras la captación de potasio en los rizobios parece implicar también la disminución en el contenido de poliaminas de la célula. Así, en *S. fredii* los contenidos de glutamato y potasio aumentan en respuesta a estrés hiperosmótico mientras disminuyen los de homoespermidina, aunque no los de otras poliaminas (Fujihara y Yoneyama, 1993). Estas variaciones parecen relacionadas con el

metabolismo de las poliaminas ya que, al contrario de lo que se observa en *E. coli*, no se produce exclusión al medio de dichos compuestos (Fujihara y Yoneyama, 1993).

1.2. Osmoprotectores

La mayoría de los mecanismos de osmorregulación están diseñados para ajustar las concentraciones de solutos compatibles en la célula, modulando su biosíntesis, catabolismo, absorción o secreción. Generalmente se acepta que una molécula debe acumularse a largo plazo en la célula para ser efectiva en la adaptación a estrés osmótico. Así, los osmoprotectores presentes en el medio son generalmente solutos compatibles que se captan y se acumulan intracelularmente, o precursores de éstos. Sin embargo, este concepto no es aplicable a *S. meliloti*, que cataboliza la mayoría de los osmoprotectores conocidos, incluyendo la glicina betaína y la ectoína (Bernard *et al.*, 1986; Talibart *et al.*, 1997). *S. meliloti* también se distingue por su capacidad para utilizar algunos disacáridos exógenos como osmoprotectores, incluidas moléculas comunes como la sacarosa y la trehalosa, sin que llegue a detectarse acumulación de estos compuestos en la célula (Gouffi *et al.*, 1999). El único compuesto exógeno que se acumula en *S. meliloti* a largo plazo en condiciones de estrés hiperosmótico es un análogo de la glicina betaína no metabolizable: el dimetil sulfonil propionato (DMSP) (Pichereau *et al.*, 1998). Los otros osmoprotectores habituales no se acumulan a largo plazo en *S. meliloti*, incluso aunque sean tan eficientes como la glicina betaína que se puede acumular tras un choque hiperosmótico pero se metaboliza posteriormente y es sustituida por solutos compatibles de síntesis endógena.

Así, la diferencia entre *S. meliloti* y otras bacterias no se limita a la naturaleza y la especificidad de los sistemas de transporte de osmoprotectores sino también al comportamiento y la suerte de estas moléculas una vez transportadas. En *S. meliloti*, los osmoprotectores pueden clasificarse en dos familias: osmoprotectores no acumulados, que sólo se han descrito en esta especie (Gouffi y Blanco, 2000), y solutos compatibles o sus precursores, como los que se observan en la mayoría de las bacterias.

1.3. Osmoprotectores no acumulados

En *S. meliloti*, la osmoprotección por un soluto de este tipo se produce concomitantemente con su utilización como fuente de energía y carbono. Parece que el efecto osmoprotector se debe a la estimulación de las rutas del metabolismo del estrés, que incluyen no sólo la síntesis de solutos compatibles sino también la restauración de la homeostasis en condiciones hiperosmóticas (Miller y Wood, 1996). Los osmoprotectores no acumulados presentan estructuras químicas muy diversas y entran en la célula a través de transportadores específicos.

1.3.1. La ectoína como osmoprotector no acumulado

La ectoína es un soluto compatible sintetizado *de novo* por muchas bacterias halotolerantes (Bernard *et al.*, 1993; Galinski y Trüper, 1994). Actúa como un potente osmoprotector tanto en *E. coli* como en *S. meliloti*, aunque presenta comportamientos muy distintos en estas dos bacterias: la ectoína es casi tan efectiva como la glicina betaína mejorando el crecimiento de *S. meliloti* pero no se acumula en las células sino que se degrada a cualquier osmolaridad (Talibart *et al.*, 1994). Al contrario que la glicina betaína, la ectoína no contribuye directamente a la recuperación del turgor celular sino que estimula la capacidad de adaptación de la célula aumentando los niveles citoplasmáticos de otros osmolitos sintetizados endógenamente (Gouffi *et al.*, 1999).

Se ha observado que la captación de ectoína por células de *S. meliloti* crecidas a alta o baja osmolaridad puede ocurrir a través de un sistema de tipo ABC denominado Ehu (“ectoine hydroxyectoine uptake”). Sin embargo, la expresión de los genes *ehu*, que forman un operón con los genes *eut* (“ectoine utilization”), se induce sólo por ectoína (Jebbar *et al.*, 2005) y la captación de esta molécula no aumenta en células crecidas a elevada osmolaridad. El análisis de mutantes en estos sistemas de transporte y utilización de ectoína sugiere que *S. meliloti* posee al menos otra ruta para el catabolismo de esta molécula y un transportador adicional de baja afinidad para ectoína e hidroxiectoína, aunque Ehu es el principal sistema de transporte en las condiciones

estudiadas y resulta indispensable para la osmoprotección de esta bacteria por ectoína exógena.

La suerte de la ectoína en *S. meliloti* se asemeja a la de los aminoácidos y los azúcares en otras bacterias. Puesto que *S. meliloti* no es una bacteria productora de ectoína, la conservación de una ruta catabólica de este compuesto implica que debe estar disponible en su entorno. Parece que en los nódulos pueden encontrarse compuestos estructuralmente relacionados con la ectoína (Scott *et al.*, 1987) y se ha observado que los genes *ehu* se expresan en bacteroides (Djordjevic, 2004), de modo que estos compuestos podrían ejercer una función osmoprotectora durante la simbiosis.

1.3.2. Los disacáridos como osmoprotectores no acumulados

La actividad osmoprotectora de los azúcares y polioles exógenos ha sido poco estudiada en bacterias porque estos compuestos, al contrario que las betaínas, son utilizados por los microorganismos para su crecimiento. Por ejemplo, las células osmóticamente estresadas de *E. coli* o *Erwinia chrysanthemi* no utilizan trehalosa como osmoprotector exógeno, aunque sí acumulan este compuesto mediante síntesis (Larsen *et al.*, 1987; Prior *et al.*, 1994).

En contraste con estos datos, *S. meliloti* utiliza la sacarosa como un poderoso osmoprotector (Gouffi *et al.*, 1998) y como fuente de carbono y energía simultáneamente. Además, la trehalosa y otros disacáridos (maltosa, celobiosa, gentibiosa, turanosa y palatinosa) actúan como osmoprotectores no acumulados en *S. meliloti* y *R. leguminosarum* (Gouffi *et al.*, 1999). Parece que estos osmoprotectores disacarídicos tienen en común el ser transportados por el mismo sistema que capta sacarosa en condiciones de estrés osmótico y, al igual que aquélla, no son acumulados sino que se catabolizan, contribuyendo de modo indirecto a la acumulación de solutos compatibles de síntesis endógena. Se cree que los osmoprotectores no acumulados pueden actuar mediante más de un mecanismo en *S. meliloti*, ya que es posible suprimir la capacidad de esta bacteria de utilizar los disacáridos como osmoprotectores sin afectar su capacidad para emplear otros osmoprotectores no acumulados (Barra *et al.*, 2003).

1.4. Acumulación de betaínas

Entre los principales osmolitos que las bacterias captan del medio, las betaínas, particularmente la glicina betaína y la prolina betaína, junto con su precursor, la colina, son probablemente los más eficientes. La función fisiológica más importante de las betaínas en los rizobios parece ser su utilización como fuente de energía, mientras que su contribución a la adaptación a un estrés osmótico se encuentra restringida a ciertas especies (Boncompagni *et al.*, 1999). Sin embargo, la presencia de glicina betaína o prolina betaína en el medio tiene un efecto osmoprotector en *S. meliloti* por lo que a continuación trataremos en más profundidad la acumulación de betaínas en esta bacteria.

1.4.1. Síntesis de glicina betaína

S. meliloti puede sintetizar glicina betaína a partir de colina y colina-O-sulfato (Mandon *et al.*, 2003). Esta capacidad está codificada por el operón *betICBA*. *BetI* es un represor que actúa en ausencia de colina uniéndose a una caja *betI* en su propio promotor, *BetB* es una betaína aldehído deshidrogenasa y *BetA*, una colina deshidrogenasa. Estas tres proteínas también se encuentran en *E. coli* (Lamark *et al.*, 1991). *S. meliloti*, presenta un gen adicional (*betC*) que codifica una colina sulfatasa capaz de catalizar la conversión de colina-O-sulfato y, en menor medida, de fosfatidilcolina en colina (Østerås *et al.*, 1998).

La expresión de estos genes se induce fuertemente en presencia de colina pero no responde a estrés osmótico o a bajas presiones de oxígeno. A pesar de la falta de regulación transcripcional, cuando *S. meliloti* se somete a estrés salino, la actividad de la betaína aldehído deshidrogenasa aumenta notablemente, mientras que la de las enzimas implicadas en la degradación de glicina betaína se reduce (Smith *et al.*, 1988), de modo que tras un choque osmótico, las células de *S. meliloti* pueden acumular glicina betaína.

La mutación de los genes *bet* bloquea la síntesis de glicina betaína a partir de colina, de manera que ésta última no actúa como osmoprotector. Sin embargo, estas

mutaciones no afectan al transporte de glicina betaína, ni a su función como osmoprotector exógeno (Pocard *et al.*, 1997).

1.4.2. Transporte de colina

S. meliloti puede utilizar la colina, no sólo como un precursor en la síntesis de glicina betaína, sino también para su crecimiento. Esta capacidad depende de la presencia de un locus *bet* funcional (Smith *et al.*, 1988; Østerås *et al.*, 1998), asociado con el catabolismo de la glicina betaína, que no se encuentra en *E. coli* o en *B. subtilis*. Además, debido a la presencia de una fosfatidilcolina sintasa en *S. meliloti*, que condensa directamente colina y CDP-diacilglicérido, la colina es también un precursor directo en la síntesis de fosfatidilcolina (PC) en esta bacteria (Martínez-Morales *et al.*, 2003). La presencia de PC es poco común en membranas bacterianas, pero resulta ser un componente importante de las membranas celulares en el orden *Rhizobiales*, por lo que la biosíntesis de PC es necesaria para el crecimiento normal de *S. meliloti* (De Rudder *et al.*, 2000). Para cubrir las necesidades de colina de *S. meliloti*, esta bacteria utiliza sistemas de transporte efectivos para la captación de este compuesto desde el medio externo.

En *S. meliloti* se han identificado tres actividades de transporte cinéticamente distintas para la captación de colina; la primera es constitutiva y de baja afinidad y las otras dos son de alta afinidad, una inducible por colina y otra constitutiva (Pocard *et al.*, 1989). Sin embargo, hasta ahora sólo se conoce un transportador de colina en *S. meliloti*. Se trata de un sistema de tipo ABC denominado Cho, homólogo al sistema ProU de *E. coli*, que se induce en respuesta a colina pero no a estrés osmótico y que está implicado en la captación de alta afinidad y especificidad de esta molécula (Dupont *et al.*, 2004). El sistema Cho se expresa en bacteroides de nódulos fijadores de *M. sativa* pero no se observa que su mutación tenga grandes efectos sobre la supervivencia de la bacteria en distintos medios o sobre su capacidad simbiótica (Dupont *et al.*, 2004), probablemente debido a la existencia de otras rutas de transporte aún no identificadas en esta bacteria, que podrían proporcionarle la colina necesaria.

1.4.3. Transporte de betaínas

S. meliloti posee varias actividades de transporte para la captación de betaínas y se han caracterizado tres transportadores.

El sistema Hut es un transportador de histidina de tipo ABC homólogo a ProU que también está implicado en la captación de prolina y prolina betaína con elevada afinidad y de glicina betaína con baja afinidad (Boncompagni *et al.*, 2000). Su actividad está controlada transcripcionalmente por histidina, pero no por estrés, y contribuye a la utilización de histidina como fuente de nitrógeno (Boncompagni *et al.*, 2000).

El sistema BetS es un transportador secundario de la familia BCCT con un estrecho rango de especificidad. Este transportador tiene una elevada afinidad por glicina betaína y prolina betaína y se considera un sistema de emergencia implicado en la captación rápida de betaínas por células sujetas a un choque osmótico (Boscari *et al.*, 2002). La captación de betaínas mediada por el sistema BetS es consecuencia de la activación de proteínas existentes por alta osmolaridad, ya que el gen *betS* se expresa constitutivamente en células de *S. meliloti* en vida libre. Sin embargo, un mutante en *betS* aún es capaz de utilizar la prolina betaína como osmoprotector.

El sistema Prb es un transportador de tipo ABC implicado en la captación de prolina betaína (Alloing *et al.*, 2006). Al contrario que el resto de los transportadores de tipo ABC para betaínas descritos, este sistema no es homólogo a ProU, sino a transportadores tipo oligopéptido permeasa. Prb es activo a altas y bajas osmolaridades y es necesario para una adaptación máxima a condiciones de elevada salinidad. Un doble mutante en los genes *betS* y *prb* es incapaz de utilizar la prolina betaína como osmoprotector.

En la mayoría de las bacterias, los osmoprotectores son moléculas metabólicamente inertes y no se captan activamente a bajas osmolaridades. La captación de unos pocos compuestos que tienen una doble función proporcionando energía y osmoprotección se realiza a través de sistemas de transporte diferentes. Por ejemplo, la captación de prolina como fuente de carbono y nitrógeno en *E. coli* está mediada por la permeasa PutP cuya expresión se induce por prolina (Mogi *et al.*, 1986; Nakao *et al.*, 1988) mientras que su uso para osmoadaptación requiere los transportadores osmorregulados

ProP y ProU (Csonka y Epstein, 1996). De modo semejante, en *S. meliloti*, la captación de prolina betaína a baja y alta osmolaridad se lleva a cabo a través de distintos sistemas de transporte, Hut para la obtención de energía, y BetS para la adaptación inmediata a un choque osmótico. Prb es, hasta ahora, el único sistema de captación activo en ambas condiciones (Alloing *et al.*, 2006).

Es difícil determinar la osmolaridad del citoplasma de las células vegetales infectadas. Sin embargo, se estima que en plantas no estresadas es de aproximadamente 450 mOsm/l, y en plantas estresadas por la adición de 0,3 M NaCl durante 2 semanas, se encuentra en torno a 600 mOsm/l (Trinchant *et al.*, 2004). En ese rango parece que BetS es el principal transportador de betaínas (Boscari *et al.*, 2006), al menos durante la primera fase de la adaptación a estrés hiperosmótico. A más largo plazo, se activan otros transportadores de prolina betaína presentes en *S. meliloti* y su actividad, junto con la existencia de un catabolismo para este compuesto (Trinchant *et al.*, 2004), puede modular la concentración intracelular de prolina betaína en bacteroides.

Parece importante señalar que la prolina betaína se encuentra en la alfalfa y predomina sobre otras betaínas como la glicina betaína o la trigonelina también identificadas en distintos genotipos de esta especie (Wood *et al.*, 1991). Recientemente se ha demostrado también la capacidad de plantas de alfalfa jóvenes y noduladas para acumular prolina betaína mediante síntesis *de novo* en raíces, tallos y nódulos en respuesta a tratamientos con sal (Trinchant *et al.*, 2004).

La mutación del gen *betS* reduce fuertemente el transporte de prolina betaína en bacteroides, aunque no tiene un efecto significativo sobre la nodulación y la fijación de nitrógeno, ni siquiera en plantas sometidas a estrés salino. En cambio, la sobreexpresión de *betS* conduce a un aumento del contenido de este compuesto en nódulos producidos por plantas estresadas y favorece el mantenimiento de la actividad fijadora de nitrógeno durante las fases iniciales de la adaptación a estrés osmótico de la planta (Boscari *et al.*, 2006). En esta línea, se debe señalar que estudios fisiológicos previos muestran un efecto beneficioso de la aplicación exógena de prolina betaína sobre la fijación de nitrógeno en plántulas desarrolladas *in vitro* y sometidas a estrés hiperosmótico (Pocard *et al.*, 1984). Se considera por tanto que la disponibilidad de cantidades sustanciales de

prolina betaína en los bacteroides, ya sea suplementada exógenamente o de origen endógeno, pueden aliviar, directa o indirectamente, los efectos negativos del estrés salino en la fijación de nitrógeno.

1.5. Acumulación de trehalosa

S. meliloti se encuentra naturalmente adaptada a un ligero estrés osmótico. Esta resistencia se asocia con la acumulación interna de potasio, glutamato y N-acetil glutaminil glutamina amida (NAGGN) durante la fase de crecimiento exponencial y trehalosa durante la fase estacionaria (Miller y Wood, 1996). Smith y Smith (1989) descubrieron que el dipéptido NAGGN es sintetizado *de novo* cuando *S. meliloti* se somete a estrés salino, acumulándose incluso más que la trehalosa (Smith *et al.*, 1994b). En medios con alta salinidad, este dipéptido se detectó en todas las estirpes de *S. meliloti* analizadas (Smith y Smith, 1989). Sin embargo, no se encontró en especies de *Rhizobium* menos tolerantes a sal, como *R. leguminosarum* bv. trifolii o *S. fredii*. Aunque se desconoce la ruta biosintética completa del NAGGN, se ha podido identificar una NAGGN-sintetasa ATP-dependiente cuya actividad es mayor en células crecidas en medios con elevada osmolaridad (Smith *et al.*, 1994a). Estos resultados muestran claras evidencias del papel osmorregulador del NAGGN, al menos en especies tolerantes a salinidad.

Los cultivos de *S. meliloti* osmóticamente estresados acumulan trehalosa como osmolito endógeno durante la fase tardía de crecimiento exponencial y la fase estacionaria (Sage y Vasil, 1997; Talibart *et al.*, 1994). Todos los rizobios ensayados acumulan trehalosa en cultivo. La acumulación de trehalosa se produce en *Rhizobium* en vida libre bajo condiciones de baja tensión de oxígeno, en medios con alta osmolaridad y durante la entrada en fase estacionaria (Streeter, 1987; Hoelzle y Streeter, 1990; Breedveld *et al.* 1990; Müller *et al.* 1994).

S. meliloti puede utilizar la ectoína, la glicina betaína, la prolina betaína, el pipecolato, el DMSP, la sacarosa, la trehalosa y otros disacáridos como osmoprotectores. Sin embargo, como hemos visto, la mayoría de estos solutos son catabolizados incluso en condiciones de elevada osmolaridad. Algunos solutos que

pueden acumularse en *S. meliloti*, como la glicina betaína, inhiben la síntesis *de novo* de osmolitos endógenos como el glutamato, el NAGGN y la trehalosa, asegurando la economía energética de la célula, pero sólo durante la fase *lag* y el comienzo de la fase de crecimiento exponencial. Después, la glicina betaína es catabolizada y la célula acumula solutos de síntesis endógena (glutamato y NAGGN inicialmente y trehalosa a continuación) (Talibart *et al.*, 1997)

1.5.1. Síntesis de trehalosa

Que los rizobios sintetizan trehalosa mediante la ruta TPS/TPP, se asumió originalmente porque había evidencias de que *B. japonicum* y *B. elkanii* obtenían trehalosa a partir de UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato (Salminen y Streeter, 1986). Sin embargo, los esfuerzos por obtener mutantes incapaces de sintetizar trehalosa resultaron inútiles. En 1999, Streeter y Bhagwat describieron la existencia de una segunda ruta de síntesis de trehalosa en rizobios, la MOTS/MOTTH, que era común y se detectó en numerosas especies. Estos autores presentaron además evidencias de la presencia simultánea de ambas rutas en al menos tres especies, *B. japonicum*, *B. elkanii* y *Rhizobium* sp. NGR234, y apuntaron a la posibilidad de que la presencia de varios mecanismos de síntesis de trehalosa fuera la causa de la dificultad para obtener mutantes incapaces de producir este disacárido entre los rizobios. Recientemente se ha mostrado la presencia de una tercera ruta de síntesis de trehalosa, dependiente de la trehalosa sintasa (TS), en especies del género *Bradyrhizobium* (Streeter y Gómez, 2006). Estos autores determinaron la actividad de cada una de las tres rutas de síntesis estudiadas (TPS/TPP, MOTS/MOTTH y TS) en distintas condiciones y observaron que la trehalosa sintasa (TS) presentaba el mayor nivel de actividad en nódulos mientras que la TPS era la ruta predominante en cultivos líquidos.

1.5.2. Transporte y utilización de trehalosa

En el genoma de *S. meliloti* se ha predicho la existencia de 430 sistemas de transporte de tipo ABC (Finan *et al.*, 2001). Entre ellos se han identificado dos operones que codifican sistemas de tipo ABC implicados en el transporte de trehalosa. El primero es el operón *aglEFGAK*, que codifica un sistema de transporte de azúcares implicado en la captación de sacarosa, maltosa y trehalosa (Willis y Walker, 1999) y el segundo es el operón *thuEFGK* localizado en el plásmido pSymB e implicado también en el transporte de trehalosa, maltosa y sacarosa aunque sólo se induce por trehalosa, al contrario que el sistema *aglEFGAK* que responde principalmente a sacarosa (Jensen *et al.*, 2002). Un mutante en ambos sistemas se encuentra muy afectado en el transporte de sacarosa, maltosa y trehalosa y también en la colonización de raíces de alfalfa aunque no presenta diferencias con la cepa parental en la nodulación o la fijación de nitrógeno.

La función biológica del catabolismo de la trehalosa en procariontas y eucariontas se limita al estudio de organismos en vida libre y se sabe muy poco de su implicación en las interacciones simbióticas y patogénicas. Las enzimas que constituyen la principal ruta asimilatoria de trehalosa en *S. meliloti* están codificadas por los genes *thuA* y *thuB*, que son inducibles por trehalosa y se expresan en las bacterias de la zona de infección del nódulo aunque no en la zona simbiótica (Jensen *et al.*, 2005). Los mutantes en estos genes presentan importantes dificultades en la colonización de la raíz de plantas de alfalfa. La capacidad de utilización de trehalosa parece ser esencial en este proceso, lo que indicaría que la trehalosa puede representar una importante fuente de carbono durante la colonización saprofítica de la raíz. Sin embargo, estos mutantes mostraron una mayor competitividad para formar nódulos, probablemente debido a que la acumulación intracelular de trehalosa provocada por la ausencia de degradación puede mejorar la capacidad de las bacterias para enfrentarse a los distintos tipos de estrés con los que se encuentran durante el proceso de infección (Jensen *et al.*, 2005).

1.5.3. Acumulación de trehalosa en el nódulo

La presencia de elevadas concentraciones de trehalosa en los nódulos de soja al comienzo de la fijación de nitrógeno se observó hace ya más de 25 años (Streeter, 1980). En la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, la trehalosa se almacena en los nódulos de la raíz durante su desarrollo y se convierte en el carbohidrato predominante en bacteroides (Salminen y Streeter, 1986). Dada la gran demanda de fuentes carbonadas que requiere un bacteroide fijador para generar la energía necesaria para la actividad nitrogenasa, resulta paradójico que utilice buena parte de ese carbono en la acumulación de un azúcar, la trehalosa, en cuya síntesis se invierten glucosa y ATP. Debe insistirse aquí en que la trehalosa sintetizada por el bacteroide es uno de los azúcares no estructurales más abundantes en los nódulos de las leguminosas, pudiendo llegar a constituir cerca del 1% del peso seco del nódulo (Müller *et al.* 2001).

Se cree que la trehalosa actúa como un osmoprotector en bacteroides (Streeter, 1985; Mellor, 1992). Esta idea está avalada por las evidencias de que la acumulación de trehalosa en nódulos de *Phaseolus vulgaris* aumenta en condiciones de escasez de agua y que se correlaciona positivamente con la resistencia a la sequía entre cultivares (Farías-Rodríguez *et al.*, 1998). Por otra parte, se ha observado que la trehalosa se acumula en nódulos durante la senescencia. Dicha acumulación puede ser la explicación al mantenimiento del número de bacterias viables aisladas de los nódulos durante el proceso de senescencia (Müller *et al.*, 1994), ya que la trehalosa puede proteger a estas células de daños en la membrana o actuar como reserva de energía. Así, una buena parte de la población bacteriana puede mantener la viabilidad, tal y como predicen los modelos evolutivos que se barajan actualmente (Provorov, 2001).

Se piensa que la trehalosa producida por el microsimbionte es inductora de la actividad trehalasa en el nódulo. Ambas, trehalosa y trehalasa, podrían tener un papel regulador del metabolismo carbonado en plantas (Goddijn y van Dun, 1999) ya que existe una correlación entre los niveles de trehalosa y las actividades sacarosa sintasa e invertasa en los nódulos (Müller *et al.*, 1998). Este hecho resulta de interés primordial para el funcionamiento del bacteroide, que requiere los sustratos carbonados producidos por la planta como fuente de energía para llevar a cabo la fijación del nitrógeno

atmosférico por lo que la acumulación de trehalosa puede tener varias funciones de gran interés en relación con la simbiosis.

1.6. Cambios en las envolturas celulares

Otras respuestas inducidas por sal en los rizobios son cambios en la morfología y el tamaño celular o modificaciones en el patrón de polisacáridos extracelulares (EPS) y lipopolisacáridos (LPS) (Lloret *et al.*, 1995; Soussi *et al.*, 2001). Las últimas respuestas pueden tener un fuerte impacto sobre las interacciones simbióticas ya que el EPS y el LPS son muy importantes durante el desarrollo de los nódulos. También se sabe que la acumulación de β -glucanos cíclicos en el espacio periplásmico es una respuesta adaptativa importante de las rhizobacterias a ambientes hipoosmóticos (Miller y Wood, 1996). Estos compuestos son semejantes a los MDOs descritos en enterobacterias y su síntesis y transporte al periplasma está codificada en *S. meliloti* por los genes *ndvB* y *ndvA*. La estructura y composición de los glucanos cíclicos de *B. japonicum* difiere de la de *S. meliloti*, y se sabe que además de *ndvA* y *ndvB* hay dos genes adicionales implicados en su síntesis: *ndvC* (Bhagwat *et al.*, 1996) y *ndvD* (Chen *et al.*, 2002).

La presencia de β -glucanos cíclicos aumenta en el periplasma en respuesta a condiciones hipoosmóticas y disminuye cuando la concentración de solutos externa aumenta. Al contrario de lo descrito en *E. coli*, un bloqueo de la síntesis de estas moléculas en *S. meliloti* o *B. japonicum* provoca problemas de crecimiento en medios hipoosmóticos aunque curiosamente los mutantes en el gen *ndvA* de *B. japonicum* son sensibles a altas concentraciones de NaCl (Wiedermann y Müller, 2004). Además, los mutantes afectados en la producción de glucanos cíclicos de *S. meliloti* y *B. japonicum* exhiben un fenotipo pleiotrópico, que incluye una elevada sensibilidad a péptidos antimicrobianos (Mithöfer *et al.*, 2001; Nogales *et al.*, 2006) y una clara incapacidad para desarrollar simbiosis efectivas (Dylan *et al.*, 1990; Mithöfer, 2002).

Objetivos

La salinidad es uno de los factores que más contribuyen al deterioro de la estructura del suelo y de su fertilidad, perjudicando al desarrollo agrícola. Se ha descrito que la salinidad del suelo puede tener efectos adversos sobre el establecimiento y el funcionamiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. El incremento en la osmolaridad extracelular inhibe el crecimiento y la supervivencia de la bacteria en el suelo, afecta al proceso de infección y desarrollo del nódulo, a su funcionamiento y por tanto, a la capacidad fijadora de nitrógeno, por lo que es necesaria la selección de cepas y variedades de plantas simbióticamente eficientes y adaptadas o tolerantes a la sal. En estudios anteriores se ha observado que genes de la bacteria necesarios para la adaptación en vida libre a estrés salino y osmótico están también involucrados en diversas etapas de la simbiosis (Nogales *et al.*, 2002; Miller-Williams *et al.*, 2006). Estos datos sugieren que genes de *Rhizobium* importantes en la adaptación a estrés osmótico en vida libre son necesarios para el normal establecimiento de la asociación simbiótica. En consecuencia, el conocimiento de los mecanismos concretos de adaptación a estrés hiperosmótico que utilizan estas bacterias en vida libre podrían tener una aplicación en la mejora de su capacidad de adaptación en suelo y de su eficiencia en el establecimiento de simbiosis fijadoras de nitrógeno. Se sabe que la respuesta a estrés hiperosmótico en bacterias implica inicialmente la captación de potasio a través de sistemas específicos y a continuación la acumulación de compuestos, conocidos como solutos compatibles, que pueden alcanzar elevadas concentraciones intracelulares sin interferir con el metabolismo celular. En los rizobios, también se ha observado que la primera fase del proceso de osmoadaptación incluye la captación de potasio aunque no se han estudiado los sistemas implicados en su transporte. Posteriormente, el potasio es sustituido por compuestos de síntesis endógena entre los que cabe destacar el glutamato, el NAGGN y la trehalosa.

Con estos antecedentes se planteó como objetivo general la identificación de nuevas respuestas osmoadaptativas en rizobios, así como el estudio en estas bacterias de mecanismos conocidos de adaptación a estrés osmótico y de su importancia para el establecimiento de simbiosis formadoras de nódulos determinados o indeterminados con leguminosas.

De acuerdo con lo expuesto, se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.- Identificación y caracterización de genes involucrados en la respuesta adaptativa temprana de *Sinorhizobium meliloti* al estrés salino e hiperosmótico.
- 2.- Estudio del papel de transportadores de potasio en la osmotolerancia de *Rhizobium* y en el establecimiento de simbiosis fijadoras de nitrógeno.
- 3.- Importancia de la síntesis y acumulación de trehalosa por *Rhizobium* para la adaptación a estrés hiperosmótico y para el establecimiento de simbiosis fijadoras de nitrógeno.

Material y Métodos

1. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS

En las tablas 1.1 y 1.2 se señalan las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo, junto con sus características más relevantes.

Tabla 1.1 Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo

Cepa	Características relevantes	Fuente o Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE44, ΔlacU169, f80, lacZΔM, 5hsdR171, recA1, endA1, gyrA96, thi1, relA1</i>	Bethesda Research Laboratory®
S17.1	<i>thi, pro, recA, hsdR, hsdM, Rp4Tc::Mu, Km::Tn7; Tp^R, Sm^R, Spc^R</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
1021	Derivada de 2011, cepa silvestre; Sm ^R	Meade <i>et al.</i> , 1982
10OtSS	Derivada de 1021 (Δ otsA::Sm/Spc); Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
10MOTK	Derivada de 1021 (Δ treY::Km); Sm ^R , Km ^R	Este trabajo
10treS	Derivada de 1021 (<i>treS</i> ::pSUP202Pol4); Sm ^R , Tc ^R	Este trabajo
10OtM	Derivada de 10OtSS (Δ treY::Km); Km ^R , Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
10treSY	Derivada de 10treS (Δ treY::Km); Km ^R , Sm ^R , Tc ^R	Este trabajo
10trOt	Derivada de 10treS (Δ otsA::Sm/Spc); Sm ^R , Spc ^R , Tc ^R	Este trabajo
10SYOt	Derivada de 10treSY (Δ otsA::Sm/Spc); Sm ^R , Spc ^R , Tc ^R , Km ^R	Este trabajo
10K1K	Derivada de 1021 (Δ kup1::Km); Km ^R , Sm ^R	Este trabajo
10K2SS	Derivada de 1021, (Δ kup2::Sm/Spc); Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
10tAG	Derivada de 1021 (Δ trkA::aacC1); Gm ^R	Este trabajo
10KdpSS	Derivada de 1021 (Δ kdpA::Sm/Spc); Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
10K2K1	Derivada de 10K2SS (Δ kup1::Km); Km ^R , Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
10tAK1	Derivada de 10tAG (Δ kup1::Km); Gm ^R , Km ^R , Sm ^R	Este trabajo
10tAK2	Derivada de 10tAG (Δ kup2::Sm/Spc); Sm ^R , Gm ^R , Spc ^R	Este trabajo
10tAKdp	Derivada de 10tAG (Δ kdpA::Sm/Spc); Sm ^R , Gm ^R , Spc ^R	Este trabajo
10tAK21	Derivada de 10tAK2 (Δ kup1::Km); Gm ^R , Km ^R , Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
10tAKK	Derivada de 10tAKdp (Δ kup1::Km); Gm ^R , Km ^R , Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
<i>Mesorhizobium loti</i>		
MAFF303099	Cepa silvestre	Kaneko <i>et al.</i> , 2000
MOtSS	Derivada de MAFF303099 (Δ otsA1::Sm/Spc); Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
MOt2K	Derivada de MAFF303099 (Δ otsA2::Km); Km ^R	Este trabajo
MKdpT	Derivada de MAFF303099 (Δ kdpA::Tc); Tc ^R	Este trabajo
MKup2	Derivada de MAFF303099 (<i>kup2</i> ::pSUP202Pol4); Tc ^R	Este trabajo

Tabla 1.2 Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pBSKS(+)	Vector de clonación; Ap ^R	Stratagene®
pUC18	Vector de clonación; Ap ^R	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pGEM [®] -T Easy	Vector de clonación para productos de PCR; Ap ^R	Promega®
pJB3Tc19	Vector de clonación derivado de pRK2, Mob ⁺ , Tc ^R , Ap ^R	Blatny <i>et al.</i> , 1997
pCR [®] -XL-TOPO [®]	Vector de clonación para productos de PCR; Km ^R	Invitrogen [™]
pRK2013	Plásmido movilizador, Km ^R	Figurski y Helinski, 1979
pHP45Ω	Plásmido portador del cassette Sm/Spc; Sm ^R , Spc ^R , Ap ^R	Prentki y Krisch, 1984
pHP45Ω-Km	Plásmido portador del cassette Km; Km ^R , Ap ^R	Fellay <i>et al.</i> , 1987
pHP45Ω-Tc	Plásmido portador del cassette Tc; Tc ^R , Ap ^R	Fellay <i>et al.</i> , 1987
pMS255	Plásmido portador del gen <i>aacC1</i> de resistencia a Gm; Ap ^R , Gm ^R	Becker <i>et al.</i> , 1995
pK18 <i>mobsacB</i>	Plásmido suicida en <i>Rhizobium</i> ; Mob ⁺ , <i>sacB</i> ; Km ^R	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pSUP202Pol4	Plásmido suicida derivado de pSUP202 portador del lugar de múltiple clonación desde <i>DraII</i> a <i>EcoRI</i> de pBSL II; Tc ^R	Fischer <i>et al.</i> , 1993
p53Gus	Plásmido derivado de pBBR1MCS5, portador del gen <i>gus</i> de pWM5 (pBBR1MCS5:: <i>uidA</i>)	L. Girard (CCG, Méjico)
pGUS3	Vector derivado de pBII01 (CLONTECH) portador de la fusión transcripcional <i>nfeD</i> :: <i>gus</i> ; Km ^R	García-Rodríguez y Toro, 2000
pBSOt-10	Derivado de pBSKS(+) que contiene un fragmento amplificado por PCR de 3 Kb en el que se encuentra el gen <i>otsA</i> de <i>S. meliloti</i> ; Ap ^R	Este trabajo
pBSOtSS	Derivado de pBSOt-10 en el que el gen <i>otsA</i> ha sido delecionado e interrumpido por un cassette Sm/Spc; Ap ^R , Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
pK0tSS	Derivado de pK18 <i>mobsacB</i> que contiene el fragmento Δ <i>otsA</i> ::Sm/Spc de pBSOtSS; Km ^R , Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
p53otsA	Derivado de p53Gus portador de la fusión transcripcional <i>otsA</i> :: <i>gus</i> de <i>S. meliloti</i> ; Gm ^R	Este trabajo
pGEMOT	Derivado de pGEM [®] -T Easy que contiene un fragmento amplificado por PCR de 3,2 Kb en el que se encuentra el gen <i>treY</i> de <i>S. meliloti</i> ; Ap ^R	Este trabajo

pGMotK	Derivado de pGEMOT en el que el gen <i>treY</i> ha sido delecionado e interrumpido por un cassette Km; Ap ^R , Km ^R	Este trabajo
pSMotK	Derivado de pSUP202Pol4 que contiene el fragmento $\Delta treY::Km$ de pGMotK; Tc ^R , Km ^R	Este trabajo
p53MOTS	Derivado de p53Gus portador de la fusión transcripcional <i>treY::gus</i> de <i>S. meliloti</i> ; Gm ^R	Este trabajo
pGtreS	Derivado de pGEM [®] -T Easy que contiene un fragmento amplificado por PCR de 3,2 Kb en el que se encuentra el gen <i>treS</i> de <i>S. meliloti</i> ; Ap ^R	Este trabajo
pStreS-1Kb	Derivado de pSUP202Pol4 que contiene un fragmento de 1 Kb interno a <i>treS</i> procedente de pGtreS; Tc ^R	Este trabajo
pBSK1-1	Derivado de pBSKS(+) que contiene un fragmento amplificado por PCR de 3,5 Kb en el que se encuentra el gen <i>kup1</i> de <i>S. meliloti</i> ; Ap ^R	Este trabajo
pUCK1	Derivado de pUC18 que contiene el framento amplificado presente en pBSK1-1; Ap ^R	Este trabajo
pUCK1K	Derivado de pUCK1 en el que el gen <i>kup1</i> ha sido delecionado e interrumpido por un cassette Km; Ap ^R , Km ^R	Este trabajo
pKK1K	Derivado de pK18 <i>mobsacB</i> que contiene el fragmento $\Delta kup1::Km$ de pUCK1K; Km ^R	Este trabajo
pJB3K1	Derivado de pJB3Tc19 que contiene el fragmento amplificado presente en pBSK1-1; Tc ^R	Este trabajo
pBSK2-7	Derivado de pBSKS(+) que contiene un fragmento amplificado por PCR de 3,4 Kb en el que se encuentra el gen <i>kup2</i> de <i>S. meliloti</i> ; Ap ^R	Este trabajo
pBSK2E	Derivado de pBSK2-7 en el que se ha eliminado el sitio <i>EcoRI</i> del lugar de clonación múltiple (MCS); Ap ^R	Este trabajo
pBSK2SS	Derivado de pBSK2E en el que el gen <i>kup2</i> ha sido delecionado e interrumpido por un cassette Sm/Spc; Ap ^R , Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
pKK2SS	Derivado de pK18 <i>mobsacB</i> que contiene el fragmento $\Delta kup2::Sm/Spc$ de pBSK2SS; Km ^R , Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
pGEMtA	Derivado de pGEM [®] -T Easy que contiene un fragmento amplificado por PCR de 2,2 Kb en el que se encuentra el gen <i>trkA</i> de <i>S. meliloti</i> ; Ap ^R	Este trabajo
pBStA	Derivado de pBSKS(+) que contiene el fragmento amplificado presente en PGEMtA; Ap ^R	Este trabajo
pBStAG	Derivado de pBStA en el que el gen <i>trkA</i> ha sido delecionado e interrumpido por el gen <i>aacC1</i> que confiere resistencia a Gm; Ap ^R , Gm ^R	Este trabajo
pStAG	Derivado de pSUP202Pol4 que contiene el fragmento $\Delta trkA::aacC1$ de pBStAG; Tc ^R , Gm ^R	Este trabajo

pJB3tA	Derivado de pJB3Tc19 que contiene el fragmento amplificado presente en pBStA; Tc ^R	Este trabajo
pGKdp	Derivado de pGEM [®] -T Easy que contiene un fragmento amplificado por PCR de 2,9 Kb en el que se encuentra el gen <i>kdpA</i> de <i>S. meliloti</i> ; Ap ^R	Este trabajo
pGKdpSS	Derivado de pGKdp en el que el gen <i>kdpA</i> ha sido delecionado e interrumpido por un cassette Sm/Spc; Ap ^R , Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
pKKdpSS	Derivado de pK18 <i>mobsacB</i> que contiene el fragmento $\Delta kdpA::Sm/Spc$ de pGKdpSS; Km ^R , Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
pGIotsA	Derivado de pGEM [®] -T Easy que contiene un fragmento amplificado por PCR de 2,4 Kb en el que se encuentra el gen <i>otsA1</i> de <i>M. loti</i> ; Ap ^R	Este trabajo
pGIotSS	Derivado de pGIotsA en el que el gen <i>otsA1</i> ha sido interrumpido por un cassette Sm/Spc; Ap ^R , Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
pSIotSS	Derivado de pSUP202Pol4 que contiene el fragmento <i>otsA::Sm/Spc</i> de pGIotSS; Tc ^R , Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
pGIotsA2	Derivado de pGEM [®] -T Easy que contiene un fragmento amplificado por PCR de 2,7 Kb en el que se encuentra el gen <i>otsA2</i> de <i>M. loti</i> ; Ap ^R	Este trabajo
pBSIot2	Derivado de pBSKS(+) que contiene el fragmento amplificado presente en pGIotsA2; Ap ^R	Este trabajo
pBSIot2K	Derivado de pBSIot2 en el que el gen <i>otsA2</i> ha sido delecionado e interrumpido por un cassette Km; Ap ^R , Km ^R	Este trabajo
pSIot2K	Derivado de pSUP202Pol4 que contiene el fragmento $\Delta otsA2::Km$ de pBSIot2K; Tc ^R , Sm ^R , Spc ^R	Este trabajo
pGIKdp-3	Derivado de pGEM [®] -T Easy que contiene un fragmento amplificado por PCR de 3 Kb en el que se encuentra el gen <i>kdpA</i> de <i>M. loti</i> ; Ap ^R	Este trabajo
pGIKdpT	Derivado de pGIKdp-3 en el que el gen <i>kdpA</i> ha sido delecionado e interrumpido por un cassette Tc; Tc ^R , Ap ^R	Este trabajo
pKlKdpT	Derivado de pK18 <i>mobsacB</i> que contiene el fragmento $\Delta kdpA::Tc$ de pGIKdpT; Tc ^R , Km ^R	Este trabajo
pGIKup	Derivado de pGEM [®] -T Easy que contiene un fragmento amplificado por PCR de 4,2 Kb en el que se encuentra el gen <i>kup2</i> de <i>M. loti</i> ; Ap ^R	Este trabajo
pSIKup-1Kb	Derivado de pSUP202Pol4 que contiene un fragmento de 1 Kb interno a <i>kup2</i> procedente de pGIKup; Tc ^R	Este trabajo

2. MEDIOS DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

2.1. Medios de cultivo para *E. coli*

Para el cultivo rutinario de las cepas de *E. coli* se utilizó el medio de Luria-Bertani (LB) (Miller, 1972):

NaCl.....	5 g
Triptona.....	10 g
Extracto de levadura.....	5 g
Agua (desionizada).....	1.000 ml
Agar (para medio sólido).....	15 g

El medio se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Cuando fue necesario establecer la ausencia de *E. coli* en un cultivo, se utilizó ENDO AGAR, un medio selectivo para coliformes en el que *Rhizobium* no crece. Dicho medio se preparó siguiendo las recomendaciones del fabricante (DIFCO): se resuspendieron 41,5 gramos del preparado comercial en 1 litro de agua desionizada y se hirvió hasta su completa disolución. Se esterilizó a 121°C durante 15 minutos y se utilizó siempre inmediatamente tras su preparación.

2.2. Medios de cultivo para *Rhizobium*

Las cepas de *Rhizobium* se crecieron rutinariamente a 28°C en medio TY (Beringer, 1974):

Triptona.....	5 g
Extracto de levadura.....	3 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O.....	0,45 g
Agua desionizada.....	1.000 ml
Agar (medio sólido).....	15 g

Como medio mínimo (MM) para *Rhizobium* se empleó el medio de Robertsen y colaboradores (1981) modificado:

K ₂ HPO ₄	0,3 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0,15 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O.....	0,05 g
FeCl ₃	0,006 g
NaCl.....	0,05 g
Glutamato sódico.....	1,1 g
Manitol.....	10 g
Agua desionizada.....	1.000 ml
Agar purificado (medio sólido).....	13 g

Las vitaminas (biotina, pantotenato y tiamina) se añadieron al medio mínimo inmediatamente antes de su utilización, a partir de una solución madre 1.000 veces concentrada que se preparó en agua desionizada, se esterilizó por filtración y se conservó a 4°C:

Biotina.....	0,2 g
Tiamina.....	0,1 g
Pantotenato sódico.....	0,1 g
Agua desionizada.....	1.000 ml

Todos los medios se prepararon ajustando el pH a 6,8-7,2, y se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Cuando fue necesario utilizar un pH determinado, el medio se tamponó con Tris/MES 5 mM. El medio mínimo con bajo contenido en potasio se preparó sustituyendo los fosfatos potásicos por Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0,5 mM y se tamponó a pH 7 con Tris/MES 5 mM.

2.3. Conservación de cepas bacterianas

Para la conservación prolongada de las distintas cepas se utilizaron criotubos que contenían alícuotas de cultivos bacterianos adicionados de glicerol estéril a una concentración final del 20%. Los criotubos se mantuvieron almacenados a una temperatura de -80°C.

2.4. Antibióticos

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se hizo a partir de soluciones 100 veces concentradas de los mismos preparadas en agua desionizada o, en el caso de la tetraciclina, en metanol al 100%. La esterilización de las soluciones acuosas se llevó a cabo empleando unidades de filtración Acrodisc® Syringe Filters con Supor® Membrane (Pall), de 0,2 µm de tamaño de poro y 2,5 cm de diámetro. La concentración final de los distintos antibióticos fue la siguiente:

Antibiótico	Concentración (µg/ml)		
	<i>S. meliloti</i>	<i>M. loti</i>	<i>E. coli</i>
Espectinomicina (Spc)	100	100	50
Estreptomina (Sm)	200	100	50
Tetraciclina (Tc)	0,1	0,5	10
Kanamicina (Km)	200	200	50
Ampicilina (Ap)	-	-	200
Gentamicina (Gm)	20	-	30

3. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.1. Preparación de ADN plasmídico

3.1.1. Preparación de ADN plasmídico mediante lisis alcalina

La obtención de ADN plasmídico se realizó siguiendo el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Para ello, las células de 1,5-3 ml de cultivo se recogieron por centrifugación (14.000xg, 2 minutos) en tubos Eppendorf. En el caso de cultivos

de *Rhizobium*, las células se lavaron con 500 µl de sarcosil (N-lauril sarcosina) al 0,1% en TE8 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Después de eliminar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 100 µl de solución I (glucosa 50 mM, EDTA·Na₂ 10 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 8) adicionada de lisozima (4 mg/ml). Las células se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el preparado anterior se mezcló mediante inversión con 200 µl de solución II (NaOH 0,2 M, SDS 1%) y se incubó en hielo 5 minutos. Pasado este tiempo, se incorporaron 150 µl de solución III (60 ml de acetato potásico 5 M, 11,5 ml de ácido acético glacial y 28,5 ml de agua). Se mezcló por inversión del tubo y, después de incubarlo en hielo durante 5 minutos, se centrifugó (14.000xg, 5 minutos).

El sobrenadante obtenido (aproximadamente 400 µl) se transfirió a un nuevo tubo, al que se añadió un volumen igual de una mezcla fenol:cloroformo (1:1) que se preparó a partir de fenol al 100% que contenía 8-hidroxiquinoleína al 0,1% en Tris-HCl 0,1 M (pH 8), y de una mezcla de alcohol isoamílico y cloroformo en proporción 1:24.

Tras mezclar bien por agitación en vórtex, se separaron las dos fases mediante centrifugación (14.000xg, 5 minutos). La fase superior acuosa, que contiene el ADN, se transfirió a un tubo nuevo, se mezcló con 2,5 volúmenes de etanol absoluto preenfriado a -20°C, se incubó a -80°C durante 30 minutos y se centrifugó (14.000xg, 15 minutos).

El sedimento se lavó con etanol al 70% preenfriado a -20°C y se centrifugó de nuevo (14.000xg, 5 minutos). Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado se secó al vacío y se resuspendió en 20-50 µl de tampón TE8 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) o de agua bidestilada.

Para eliminar el ARN, al volumen anterior se le puede añadir 1 µl de ribonucleasa A concentrada (10 mg/ml en NaCl 15 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 7,5). Antes de su utilización, la solución concentrada de RNasa se calentó a 100°C durante 15 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se prepararon alícuotas y se almacenaron a -20°C. Alternativamente, el ARN se puede eliminar durante la digestión con enzimas de restricción utilizando una dilución 1/200 de la solución concentrada de RNasa en agua bidestilada para completar el volumen de digestión.

3.1.2. QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen)

Se utilizó este protocolo cuando fue necesaria la obtención de ADN con una elevada calidad. A partir de un cultivo líquido de 1-5 ml de *E. coli*, las células se precipitaron, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 250 µl del tampón P1 previamente adicionado de RNasa A, según las instrucciones del proveedor. Posteriormente, se incorporaron 250 µl del tampón P2, mezclando suavemente mediante inversión del tubo. P2 es un tampón de lisis, y se recomienda mantener la reacción un máximo de 5 minutos. A la mezcla anterior se le añadieron 350 µl de tampón N3, se mezcló por inversión y se centrifugó (14.000xg) hasta la formación de un precipitado compacto (aproximadamente 10 minutos). Se recogió el sobrenadante y se aplicó a una columna Qiaprep que se centrifugó durante 1 minuto de modo que el ADN plasmídico quedó retenido en la columna y se eliminó el eluido. La columna se lavó con 750 µl de tampón PE y se centrifugó 1 minuto a 14.000xg, repitiéndose de nuevo la centrifugación para eliminar el exceso de tampón. Finalmente, la columna se colocó en un tubo de 1,5 ml, se añadieron 50 µl de agua bidestilada estéril, y pasado 1 minuto se centrifugó (14.000xg, 1 minuto) para recuperar el ADN.

3.2. Preparación de ADN genómico

El aislamiento de ADN total se llevó a cabo mediante un método especialmente diseñado para *Rhizobium* en el departamento de Genética de la Universidad de Bielefeld (Alemania). De un cultivo bacteriano en fase logarítmica de la cepa elegida, se recogieron 1,5 ml por centrifugación. Las células se lavaron con 500 µl de sarcosil (N-lauril sarcosina) al 0,1% en TE8 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). El precipitado se resuspendió en 1 ml de NaCl 1 M y se dejó durante 1-2 horas a 4°C, agitando de vez en cuando. A continuación, se centrifugó a 14.000xg durante 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 250 µl de una solución de sacarosa al 20% en TE8. Después se le añadieron otros 250 µl de una solución de lisozima (5 mg/ml) y RNasa (1 mg/ml) en TE8. Se mezcló por vórtex y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Tras la incubación, se añadieron 100 µl de una solución de TE8 que contenía sarcosil al 5% y pronasa (10 mg/ml) y la mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se incorporaron 70 µl de acetato

sódico 3 M pH 5,2, 200 µl de una mezcla de fenol:cloroformo (1:1) (preparada como se indicó en el apartado 3.1.1.) y 200 µl de fenol (100% fenol y 0,1% 8-hidroxiquinoleína en Tris-HCl 0,1 M pH 8). Se agitó por vórtex durante 2-3 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 14.000xg. La fase superior se recogió en un nuevo tubo y, para eliminar impurezas, se lavó varias veces con la mezcla de fenol:cloroformo (1:1). A continuación, se lavó una última vez con 300 µl de cloroformo, se agitó bien y se centrifugó durante 3 minutos a 14.000xg. La fase superior se transfirió a un nuevo tubo y se añadieron 700 µl de isopropanol (2-propanol), se mezcló suavemente y se dejó durante 15 minutos a -20°C. Después se centrifugó durante 15 minutos a 14.000xg; el precipitado se lavó con 500 µl de etanol al 70%, se secó al vacío y se resuspendió mediante un corto vórtex en 100 µl de una dilución 1/10 de TE8. Por último, se mantuvo 30 minutos a 65°C mezclando de vez en cuando para asegurar una resuspensión completa.

3.2.1. AquaPure Genomic DNA Isolation Kit (Bio-Rad)

Se utilizó este protocolo cuando fue necesaria la obtención de ADN de elevada calidad. Se tomaron de 1-3 ml de un cultivo líquido de *S. meliloti* o *M. loti* y se precipitaron las células. Tras eliminar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 300 µl de Solución de Lisis y se incubaron durante 5 minutos a 80°C. Posteriormente, se incorporaron 1,5 µl de solución de RNasa A, se mezcló por inversión y se incubó a 37°C durante 1 hora. A la mezcla anterior se le añadieron 100 µl de Solución de Precipitación de Proteínas. Se agitó vigorosamente durante 1 minuto y se centrifugó (14.000xg) hasta la formación de un precipitado compacto (aproximadamente 3 minutos). Se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo al que se añadieron 300 µl de isopropanol (2-propanol) al 100%. Se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó 1 minuto a 14.000xg. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 300 µl de etanol al 70%; se secó al aire durante 10-15 minutos y se resuspendió mediante un corto vórtex en 50 µl de Solución de Hidratación. Finalmente, se mantuvo 30 minutos a 65°C mezclando de vez en cuando para asegurar su completa resuspensión.

3.3. Aislamiento de ARN total de *S. meliloti*

Para la obtención de ARN total de *S. meliloti* se utilizaron el RNeasy Mini Kit y el RNase-free DNase Set de Qiagen. Se tomaron 12 alícuotas de 1,5 ml de cultivo cada una, se precipitaron las células y, tras eliminar todo el sobrenadante, se congelaron en nitrógeno líquido. El precipitado obtenido a partir de cada 4,5 ml de cultivo (3 alícuotas), se resuspendió en 200 μ l de Tris-HCl 10 mM pH 8 y se incorporó a un tubo Fast Protein (Q BIOgene) que contenía 700 μ l de solución RLT (RNeasy Mini Kit, Qiagen), adicionada de β -mercaptoetanol según las instrucciones del proveedor. Para la lisis celular se utilizó un Ribolyser (Hybaid), con un nivel de intensidad de 6,5 durante 30 segundos. A continuación se incubaron los tubos en hielo durante 3 minutos y se eliminaron los restos celulares y la matriz del tubo centrifugando (13.000xg), 3 minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se realizó otra centrifugación para eliminar posibles residuos. Se transfirieron los sobrenadantes obtenidos a un tubo de polipropileno de 12 ml y se mezclaron con etanol al 98% a razón de 250 μ l de etanol por cada 450 μ l de sobrenadante. Para cada muestra se utilizaron 2 columnas RNeasy a las que se aplicó la mezcla a partes iguales (700 μ l cada vez), centrifugando (13.000xg, 30 segundos a temperatura ambiente) de modo que el ARN quedara retenido en la columna. A continuación se transfirió la columna a un nuevo tubo de recolección y se lavó una vez con 500 μ l de solución RW1 y dos veces con 500 μ l de solución RPE. Finalmente se centrifugó la columna durante 2 minutos para eliminar los restos de solución y se transfirió a un nuevo tubo. Se añadieron 30 μ l de agua para ARN (suministrada por el fabricante) y se dejó un minuto a temperatura ambiente antes de centrifugarlo a 13.000xg durante 1 minuto para recuperar el ARN. Este paso se repitió y se mezcló el ARN procedente de las dos extracciones realizadas para cada muestra hasta obtener un volumen final de 120 μ l.

A la muestra de ARN obtenida (120 μ l) se añadieron 14 μ l de solución RDD (RNase free DNase Set, Qiagen) y 6 μ l de DNasa. La mezcla se dejó durante una hora a 30°C y posteriormente se añadieron 490 μ l de solución RLT (RNeasy Mini Kit, Qiagen) y 350 μ l de etanol al 98%, se mezcló por inversión y se aplicó a una nueva columna RNeasy para retener el ARN. La columna se lavó una vez con 350 μ l

de solución RW1 y dos veces con 500 µl de solución RPE. Se secó bien por centrifugación (13.000xg, 2 minutos) y se transfirió a un nuevo tubo. Se aplicaron 50 µl de agua para ARN (suministrada con el kit) a la columna, se mantuvo durante un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 13.000xg durante 1 minuto para obtener la muestra final.

3.4. Purificación de muestras de ARN total de *S. meliloti*

Las muestras de ARN se purificaron y concentraron utilizando columnas Microcon-30 (Amicon, Millipore). Se mezcló la muestra con 500 µl de agua para ARN y se aplicó la mezcla a la columna. Se centrifugó a 13.000xg hasta que sobre la membrana quedaron unos 20 µl (8-10 minutos) y se recuperó la muestra purificada invirtiendo la columna sobre un nuevo microtubo y centrifugando a 13.000xg durante 1 minuto.

4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN y ARN

Se ha seguido el método espectrofotométrico descrito por Sambrook y colaboradores, (1989). La absorbancia ($A_{260\text{nm}}$ y $A_{280\text{nm}}$) de las soluciones de ADN en agua o en TE8 se determinó utilizando como blanco agua o TE8, respectivamente. La concentración se calcula respecto a los valores estándar de $D.O_{260\text{nm}}=1$ para soluciones con 50 µg/ml de ADN de cadena doble y para soluciones con 40 µg/ml de ARN total. La relación $D.O_{260}/D.O_{280}$ se usa como estimador de la pureza de la preparación, considerándose valores inferiores a 1,8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol. Para muestras de ADN impuras o de baja concentración, se empleó el método de comparación de fluorescencia en gel de agarosa bajo luz UV frente a marcadores de ADN de concentración conocida, también descrito por Sambrook y colaboradores (1989).

5. MANIPULACIÓN DEL ADN

5.1. Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción

La digestión total de ADN con enzimas de restricción se llevó a cabo en las condiciones óptimas para cada enzima, siguiendo las recomendaciones del proveedor (Roche®, Alemania) respecto a temperatura y tampón.

Las digestiones con más de una endonucleasa se hicieron simultáneamente cuando las enzimas requerían el mismo tampón y temperatura. En caso contrario, y siempre que fuera factible, se digirió el ADN primero con la enzima que requería el tampón de menor fuerza iónica y se añadieron posteriormente el tampón y la enzima para la segunda digestión. Cuando no fue posible, se llevó a cabo la digestión con una de las enzimas, se fenolizó y se precipitó con etanol el ADN y, posteriormente, se resuspendió en agua bidestilada, llevándose a cabo entonces la digestión con la segunda enzima.

5.2. Separación e identificación de fragmentos de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa

5.2.1. Electroforesis de ADN

La separación de fragmentos de restricción se llevó a cabo mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 0,8% sumergidos en tampón de electroforesis TBE (Tris 89 mM, EDTA-Na₂ 2,5 mM, BO₃H₂ 89 mM, pH 8,2).

El voltaje usual de trabajo ha sido de 60 V en cubetas de electroforesis Wide mini-sub[®] cell GT o Mini-sub[®] cell GT (BioRad). Como tampón de carga se ha utilizado una mezcla de sacarosa al 40% y azul de bromofenol al 0,25%, ambos preparados en agua bidestilada, en una relación de 5 µl de solución de ADN por 1 µl tampón de carga.

5.2.2. Revelado de geles y fotografía

Los geles de agarosa se revelaron utilizando un baño de agua a la que previamente se añadieron unas gotas de una solución concentrada de bromuro de etidio (1 mg/ml). Los geles se mantuvieron en el baño durante 15-20 minutos y posteriormente se observaron con luz ultravioleta (260 nm) en un transiluminador.

Las fotografías de los geles se han realizado utilizando una videocámara acoplada a un sistema de impresión de imágenes (Gelprinter vm509) o a un sistema de análisis de imagen Hood-S.N.73S/00228 (BioRad).

5.2.3. Estimación del tamaño de los fragmentos de restricción

La determinación del tamaño molecular de los fragmentos de restricción se ha efectuado a partir de la construcción de gráficas en las que se representa el logaritmo del tamaño molecular relativo (M_r) de moléculas patrón de ADN, frente a la movilidad relativa (R_f) de dichas moléculas en gel de agarosa, es decir, la distancia de migración de cada una dividida por la longitud del gel. Como marcadores de tamaño molecular se han utilizado los fragmentos de restricción del ADN del fago lambda resultantes de la digestión con endonucleasa *Hind*III (Marcador II de Boehringer).

5.3. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa: electroelución

Tras separar los fragmentos de ADN mediante una electroforesis en gel de agarosa como se describió en el apartado 5.2.1., se cortó la banda de interés y se colocó dentro de un trozo de 6-7 cm de membrana de diálisis (Spectra/Por[®] de 16 mm de diámetro y MWCO: 12-14.000) aclarado con agua destilada y sellado por uno de sus extremos con un cierre Spectra/Por[®]. Se añadieron 500 μ l de tampón de electroforesis TBE y se cerró la membrana por el otro extremo con un segundo cierre, procurando eliminar posibles burbujas.

Este montaje se sometió a una electroforesis a 120 V durante 20 minutos de modo que la banda de interés saliera del gel y quedase suspendida en el tampón de electroforesis. Para evitar que el ADN quedase adherido a la membrana, se sometió el montaje a un minuto de electroforesis a 80 V con la polaridad invertida. Tras comprobar con luz ultravioleta que no quedasen restos de ADN en el gel, se procedió a recuperar todo el tampón posible y transferirlo a un microtubo para la precipitación del ADN. Se mezcló por inversión con 50 µl de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 1 ml de etanol 100%. La mezcla se mantuvo un mínimo de 30 minutos a -80°C y a continuación se centrifugó a 14.000xg durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70% preenfriado, se secó al vacío y se resuspendió en 20 µl de solución TE8.

La membrana de diálisis (Spectra/Por[®] de 16 mm de diámetro y MWCO: 12-14.000) se trató antes de su utilización del siguiente modo: se hirvió en una solución de EDTA 1 mM y bicarbonato sódico al 2% durante 10 minutos, se aclaró dos veces con agua destilada y se conservó a 4°C en agua destilada adicionada con una pequeña cantidad de etanol 98% hasta el momento de su utilización.

5.4. Ligación de fragmentos de restricción con vectores de clonación

5.4.1. Ligación en vectores de clonación

La ligación entre un fragmento de ADN y el vector de clonación adecuado se efectuó usando relaciones molares vector:inserto de 1:3 y una cantidad total de ADN de unos 200 ng. El volumen final de mezcla de reacción fue de 10-20 µl. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de la enzima DNA ligasa del fago T4 y en el tampón indicado por el proveedor (Roche[®], Alemania), incubando durante una noche a 15°C en el caso de ligaciones de extremos cohesivos y a temperatura ambiente en el caso de ligaciones de extremos romos.

5.4.2. Generación de extremos romos a partir de extremos protuberantes en 5'

Para la creación de extremos romos en fragmentos de restricción con extremos 5' protuberantes, se procedió a rellenar el extremo 3' de la cadena complementaria de la siguiente manera: se mezclaron en un microtubo 20 µl de la solución de ADN, 1 µl de una solución 1 mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y una unidad de enzima Klenow por µg de ADN. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos y a continuación se realizó una electroforesis en gel de agarosa para purificar la muestra aislando la banda por electroelución tal y como se describe en el apartado 5.3.

5.4.3. Generación de extremos romos a partir de extremos protuberantes en 3'

Para la creación de extremos romos en fragmentos de restricción con extremos 3' protuberantes, se procedió a la eliminación de la región desapareada de la siguiente forma: en un microtubo se mezclaron 20 µl de la solución de ADN, 1 µl de una solución 2 mM de dNTPs y una unidad de ADN polimerasa del bacteriófago T4 por µg de ADN. Se incubó la mezcla durante 15 minutos a 12°C y a continuación se procedió como en el apartado anterior, llevando a cabo una electroforesis en gel de agarosa y aislando la banda de ADN por electroelución (apartado 5.3).

5.5. Secuenciación y análisis informático

5.5.1. Secuenciación automática

Se realizó en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología López-Neyra (CSIC-Granada) utilizando como cebadores los denominados universal y reverso correspondientes a las secuencias del fago M13:

Universal: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
Reverso: 5'-GAAACAGCTATGACCATG-3'

Estas secuencias se encuentran presentes en los vectores de tipo pUC18, pBSKS(+) y pGEM[®]-T Easy, que se utilizaron en este trabajo.

5.5.2 Análisis informático de secuencias de ADN

El análisis de las secuencias de ADN obtenidas se llevó a cabo utilizando los programas OMIGA 2.0 (Oxford Molecular) y Vector NTI 6.0.2.

La búsqueda de homologías de ADN y proteínas con secuencias conocidas presentes en los bancos de datos se realizó mediante Internet con el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

6. EXPERIMENTOS DE HIBRIDACIÓN ADN-ADN

6.1. Transferencia de ADN a filtros de nylon

La transferencia de fragmentos de restricción de ADN a filtros de nylon se realizó según la técnica de Southern (1975). Para ello, los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis en gel de agarosa. Una vez fotografiado el gel y establecidas sus dimensiones, se procedió a su tratamiento que consistió, siempre con agitación, en un paso de 20 minutos de depurinación ácida del ADN mediante inmersión en una solución de HCl 0,25 M. Tras lavar tres veces con agua destilada, se procedió a desnaturalizar el ADN mediante inmersión repetida en una solución de NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M, durante 15 minutos la primera vez y 25 minutos la segunda. Se lavó de nuevo 3 veces con agua destilada y por último se neutralizó con una solución de Tris-HCl 0,5 M, NaCl 3 M pH 7 en la que se incubó durante dos periodos de 15 minutos. Finalmente, el gel se saturó con 10xSSC (1xSSC: NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM, pH 7) y se colocó sobre una superficie regular, habitualmente un cristal, cubierta con papel Whatman 3MM humedecido con 10xSSC, cuyos extremos, a modo de mecha, se sumergen en un reservorio de tampón de transferencia 10xSSC. Sobre el gel se colocaron un filtro de nylon y dos piezas de Whatman 3MM de tamaño similar al gel (el filtro y las piezas Whatman se lavaron primero con agua destilada y se saturaron en tampón 10xSSC durante 30 minutos antes de su utilización). Sobre el dispositivo así preparado se colocaron varias piezas de papel de celulosa y, sobre éstas, un peso de aproximadamente 1 Kg para mantener ligeramente comprimido el sistema.

El proceso de transferencia de ADN del gel a la membrana de nylon se realizó durante una noche. Una vez finalizada la transferencia, el filtro de nylon se lavó con una solución 2xSSC para eliminar restos de agarosa, se secó durante 20 minutos a temperatura ambiente y se expuso durante 30 minutos a 120°C en vacío, para fijar el ADN a la membrana.

6.2. Marcaje de sondas de ADN

El marcaje de sondas se ha realizado empleando el sistema no radiactivo de marcaje con digoxigenina comercializado por Roche (Mannheim, Alemania), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Esta técnica consiste en la síntesis parcial de ADN a partir del ADN molde que se quiere usar como sonda. Para ello, se utiliza el ADN molde desnaturalizado por calor (95°C, 10 minutos), una mezcla de hexanucleótidos, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y digoxigenina-dUTP como nucleótido marcado, que se puede detectar mediante una reacción inmunológica específica.

Como sonda se utilizó ADN plasmídico linealizado. Se dispuso aproximadamente de 1 µg de ADN desnaturalizado en un volumen de reacción final de 20 µl. El tiempo de incubación fue siempre superior a 6 horas a una temperatura de 37°C. Posteriormente se precipitó el ADN con 2,5 µl de LiCl 4 M y 75 µl de etanol preenfriado a -20°C. Se mezcló bien y se dejó al menos 30 minutos a -80°C antes de centrifugar durante 15 minutos a 14.000xg. Se lavó el sedimento con 50 µl de etanol 70% preenfriado a -20°C, se secó al vacío y se resuspendió en 50 µl de TE8 dejándolo durante 30 minutos a 37°C.

6.3. Hibridación ADN-ADN con sonda no radiactiva

El filtro de nylon al que se había transferido el ADN se colocó en un rodillo de hibridación al que se añadieron 20-40 ml de solución de prehibridación (5xSSC, N-lauril sarcosina 0,1%, SDS 0,02%, formamida 50% y agente bloqueante al 1%) y se incubó a 42°C en un horno de hibridación Amersham al menos durante 2 horas. Después de eliminar la primera solución, se añadieron otros 10 ml de solución de

hibridación, que consistió en solución de prehibridación suplementada con el ADN sonda desnaturalizado (95°C, 10 minutos). La membrana se incubó con la solución de hibridación a la misma temperatura durante toda la noche. Terminado el proceso de hibridación, se procedió al revelado.

El filtro se lavó primero 2 veces con una solución 2xSSC y SDS al 0,1% (p/v) durante 5 minutos a temperatura ambiente, y después otras 2 veces con una solución 0,1xSSC y SDS al 0,1% (p/v) a 68°C durante 15 minutos. Una vez lavado el filtro, se procedió a la detección inmunológica del ADN hibridado usando anticuerpos específicos frente a la digoxigenina según las indicaciones de los proveedores (Roche). Finalmente, el ADN marcado se detectó por su capacidad de emisión de luz a una longitud de onda de 477 nm. Dicha emisión de luz se estableció poniendo en contacto el filtro con una película autorradiográfica Kodak X-Omat. El tiempo de exposición (de 2 a 5 horas) para la detección de las bandas de hibridación depende de la cantidad de ADN y la eficiencia del marcaje de la sonda.

Para el revelado de la película se usó revelador Neutrol Liquid NE (Agfa) y fijador N FIX 172 (Negra) a las diluciones y tiempos recomendados por las casas comerciales.

7. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

7.1. Obtención de células competentes de *E. coli*

La preparación de células competentes de *E. coli* se ha realizado según la técnica descrita por Lederberg y Cohen (1974).

A partir de un cultivo de la cepa de *E. coli* a transformar, se inoculó medio LB (1 ml cultivo por 100 ml de medio) y se incubó en agitación a 37°C durante 2 horas. Tras dejar enfriar el cultivo en hielo 10 minutos, las células se centrifugaron (12.000xg, 5 minutos, 4°C), se resuspendieron en 1 volumen de una solución de MgCl₂ 0,1 M preenfriada a 4°C, y se centrifugaron de nuevo (3.000xg, 5 minutos, 4°C). A continuación, las células se resuspendieron en 1/2 volumen de una solución de CaCl₂ 0,1 M preenfriada a 4°C y, tras mantenerlas en hielo un mínimo de 30

minutos, se centrifugaron (3.000xg, 5 minutos, 4°C) y se resuspendieron suavemente en 1/10 volumen de una solución de CaCl₂ 0,1 M y glicerol al 20% preenfriada a 4°C. Las células así preparadas se repartieron en alícuotas de 200 µl en tubos preenfriados a 4°C, que se conservaron a -80°C hasta su uso. La competencia de las células se mantuvo de esta forma durante varios meses.

7.2. Transformación de células competentes de *E. coli*

Para la transformación de células competentes con ADN plasmídico se siguió la técnica descrita por Rodríguez y Tait (1983), modificada como se indica a continuación.

Se mezclaron alícuotas de 200 µl de células competentes con ADN (0,05-0,5 µg) y se incubaron en hielo un mínimo de 30 minutos. A continuación, se sometieron a un choque térmico de 37°C durante 5 minutos y tras mantenerlas 10 minutos en hielo, se les incorporó 1 ml de medio LB y se incubaron a 37°C durante 60-90 minutos, en agitación. Transcurrido este tiempo se sembraron alícuotas de 0,1 ml en placas de medio LB adicionado de los antibióticos necesarios para la selección.

8. TRANSFERENCIA DE ADN ENTRE CEPAS BACTERIANAS

8.1. Conjugaciones simples

Esta técnica se utilizó cuando fue necesaria la transferencia de un plásmido entre cepas bacterianas. Las conjugaciones se realizaron mezclando un cultivo en fase logarítmica de crecimiento del donador (D.O._{600nm} entre 0,6 y 0,7 para *E. coli*), con otro en fase exponencial tardía del receptor (D.O._{600nm} superior a 1), en proporción 1:1. Donador y receptor se precipitaron y se lavaron varias veces con medio líquido (el mismo usado para el crecimiento del cultivo) para eliminar restos de antibióticos. Finalmente, la mezcla se resuspendió en un pequeño volumen (30 µl) y se depositó sobre un filtro Millipore estéril de 0,45 µm de poro y 2,5 cm de diámetro, previamente colocado sobre una placa de medio TY sólido. La mezcla se incubó de este modo durante 16-20 horas a 28°C. Transcurrido este tiempo la mezcla de

conjugación se resuspendió en medio líquido estéril, se lavó y se sembró sobre placas de medio selectivo.

Se utilizaron cruces control para establecer las frecuencias de aparición de resistencia espontánea a los antibióticos selectivos en cada caso.

8.2. Conjugaciones triparentales

La transferencia de plásmidos no autransmisibles desde cepas no movilizadoras de *E. coli* a *Rhizobium* se realizó según el modelo de cruce tripartito, utilizando como plásmido movilizador en *trans* pRK2013 (Figurski y Helinski, 1979). La metodología seguida es idéntica a la de los cruces simples, pero en estos casos se prepararon mezclas donador:movilizador:receptor en proporciones 1:1:1.

8.3. Transducción

Esta técnica se utilizó para el intercambio alélico entre cepas derivadas de *S. meliloti* 1021 usando el fago ϕ M12 y siguiendo el protocolo descrito por Finan y colaboradores (1984).

Se mezclaron 5 ml de medio TY semisólido (0,5% agar) fundido adicionado de sulfato de magnesio (2,5 mM MgSO₄) con 100 μ l de un cultivo de la cepa donadora a una DO_{600nm} de 0,4-0,5 y 100 μ l de una solución de fagos ϕ M12 (10⁴-10⁵ ufc/ml). La mezcla se extendió sobre una placa de TY sólido y se incubó a 28°C hasta la aparición de calvas. Para la recuperación de los lisados, se utilizaron placas con 800-1.000 calvas a las que se añadieron 3 ml de TY líquido adicionado de sulfato de magnesio (2,5 mM MgSO₄) y tras mantener las placas de 2 a 4 horas a 4°C, se recuperó el líquido y se eliminaron las bacterias por filtración. Los lisados así obtenidos se titularon y se conservaron a 4°C.

Para la determinación del título de los lisados se emplearon diluciones seriadas del lisado de las que se utilizaron 100 μ l para inocular 5 ml de medio TY semisólido adicionado de sulfato de magnesio (2,5 mM MgSO₄) junto con 100 μ l de cultivo bacteriano. La mezcla se tendió en sobrecapa y una vez solidificado el medio, se incubaron a 28°C hasta la aparición de las calvas determinándose de este modo el número de ufc/ml en el lisado.

El cultivo receptor se creció a una D.O._{600nm} de 0,8-0,9 (aproximadamente 10^8 - 10^9 ufc/ml) en TY adicionado de sulfato de magnesio (2,5 mM MgSO₄) y se infectó con el lisado de fagos obtenido a partir de la cepa donadora en una proporción 1:1. La mezcla se mantuvo a 30°C durante 20 minutos y a continuación se centrifugó a 13.000xg durante 2 minutos y se retiró el sobrenadante que contenía los fagos. Las células se lavaron 2 veces con LB y se sembraron en placas de LB sólido con los antibióticos necesarios.

9. AMPLIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para llevar a cabo la amplificación de fragmentos de ADN mediante la técnica de PCR, se preparó una mezcla de reacción con Cl₂Mg 1,5 mM, dNTPs 0,3 mM, tampón de PCR (10x), 2 unidades de Taq polimerasa (Biotherm), 0,2 unidades de Pfu (Accutherm), 50 pmol de cada cebador y 30-50 ng de ADN genómico en un volumen final de 50 µl.

Para el proceso se utilizó un termociclador Hybaid con un programa básico consistente en un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, 30 ciclos de tres pasos cada uno: desnaturalización (94°C, 1 minuto), apareamiento del cebador (57-58°C dependiendo de la secuencia del cebador, 1 minuto) y extensión (72°C, 1-4 minutos según la longitud del fragmento a amplificar) y finalmente un último ciclo de extensión (72°C, 10 minutos).

9.1. Cebadores utilizados

En la Tabla 9.1 se señalan los cebadores utilizados para la amplificación de los distintos fragmentos.

Tabla 9.1. Cebadores utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia
otsA-1	5'-TAATCTAGAGCAGGTCCATGGTTTCGATA-3'
otsA-2	5'-TAATCTAGAAATCTAGTCACTCTGGACAC-3'
MOT-1	5'-TAAGGATCCGTCGAAGACGTGCTTGAAGA-3'
MOT-2	5'-TAAGGTACCACGCTCGAATGGCTGATCCT-3'
treS-1	5'-TAATCTAGACGTCTGCTTTTTTCGCTACAT-3'
treS-2	5'-TAATCTAGACCGACATTGTGGAGGTAGAT-3'
trkA-1	5'-TAATCTAGACGATCAGCATATCATGACC-3'
trkA-2	5'-TAATCTAGACCACGATCCATACATTTCGTC-3'
kdp-1	5'-TAAGAATTCATACCTGCACTGACGAGAAG-3'
kdp-2	5'-TAAGAATTCACATCGAGAACGAAGAAGAG-3'
kup1-1	5'-TAAGAGCTCGCTACGACATCTTCGGTCAT-3'
kup1-2	5'-TAATCTAGAGCACTTCCAGGAAAAGTGTG-3'
kup2-1	5'-TAATCTAGAGCCTGTTGACGACGATCAGT-3'
kup2-2	5'-TAAGATATCGGGTCCAGATCTAGCTACG-3'
ots-loti-1	5'-GCTTGAGAAGGCTGGAAATG-3'
ots-loti-2	5'-TTGCTTCAACCTAATCGGAG-3'
MlotsA2-1	5'-TAACTCGAGTTTCTGGATGGAAGACCTCG-3'
MlotsA2-2	5'-TAATCTAGAATTCATCACCGACAACCACC-3'
kup1-loti	5'-TAACCCGGGCCCTATCTGTTCCCATCAAAG-3'
kup2-loti	5'-TAACCCGGGACCGTCGTCACCAGCATGTT-3'
kdp1-loti	5'-TAAGAATTCTCCCTTGTACTCCTCATGA-3'
kdp3-loti	5'-TAAGAATTCTGAACCACAGCCAGATGATG-3'

10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD β -GLUCURONIDASA

Los ensayos de expresión génica se llevaron a cabo con las cepas de *Rhizobium* portadoras de una fusión con el gen *gus* en medio mínimo adicionado de gentamicina a lo largo de la curva de crecimiento. Se utilizaron 0,2-1 ml del cultivo, según la D.O._{600nm}. Las células se precipitaron y, tras eliminar el sobrenadante, se resuspendieron en 940 μ l de tampón de ensayo (tampón fosfato sódico 50 mM, DTT 5 mM y EDTA 1 mM), 50 μ l de SDS 0,1% y 100 μ l de cloroformo. Se agitaron dos veces durante 15 segundos y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Una vez

pasado este tiempo, se añadieron 10 µl de PNPG 100 mM (p-nitrofenil-β-D-glucuronido) precalentado a 37°C. La mezcla se incubó a 37°C hasta que se detectó el cambio de color y entonces se paró la reacción con 200 µl de Na₂CO₃ 1 M y se anotó el tiempo transcurrido. Se centrifugó durante 5 minutos a 13.000xg y se midió la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 405 nm. Las unidades Miller se calcularon según la ecuación:

$$U_{Miller} = \frac{DO_{405nm} \cdot 1000}{T \cdot V \cdot DO_{600nm}}$$

Donde:

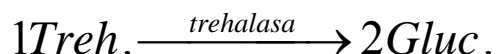
T = Tiempo (minutos)

V = Volumen de cultivo utilizado (ml)

11. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TREHALOSA

La determinación de la concentración de trehalosa se llevó a cabo por colorimetría. Se cultivaron las cepas a estudiar en las condiciones de interés en matraces de 50 ml. Se recogieron 4 alícuotas de 10 ml y se procedió a realizar extracciones etanólicas de los precipitados celulares obtenidos, para lo cual se resuspendieron en 1 ml de etanol 75% y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 24 horas. Luego se centrifugó (14.000xg, 3 minutos) y se recuperó el sobrenadante. El proceso de extracción se repitió y el sobrenadante obtenido se desecó en un “speed-vac”. El precipitado se resuspendió en 250 µl de tampón citrato 135 mM a pH 5,7. La fracción no soluble se eliminó mediante centrifugación y a continuación se procedió a tratar tres de las réplicas con trehalasa comercial (Sigma) adicionando 2 µl de enzima (4 U/ml) a las muestras precalentadas a 37°C. Las cuatro réplicas se mantuvieron a 37°C durante 1 hora. Se añadieron entonces 250 µl de tampón Tris 500 mM a pH 7,5 para detener la reacción. Volvió a centrifugarse para eliminar restos de la fracción no soluble y se tomaron 50-250 µl para determinar glucosa utilizando el Kit de determinación de glucosa (GO) de Sigma según las instrucciones del fabricante. La réplica no tratada con trehalasa nos permite

establecer qué parte de la glucosa determinada se encontraba en la muestra antes del tratamiento enzimático. La glucosa restante procede de la acción de la trehalasa según la reacción:



Se procedió a determinar la cantidad de trehalosa presente en cada réplica según la cantidad de glucosa determinada, una vez sustraída la glucosa presente en la réplica no tratada con trehalasa y teniendo en cuenta la fracción de muestra utilizada para cada determinación.

Para establecer la cantidad de trehalosa por mg de proteína se determinó la concentración de proteínas en el cultivo utilizando el “Bio-Rad Protein Assay” (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante.

12. EXPERIMENTOS DE MICROARRAYS

12.1. Reversotranscripción del ARN

Se tomaron 10 µg de ARN total de *Rhizobium* purificado y se llevaron a un volumen final de 16 µl con agua. Se añadieron 2 µl de una mezcla de hexanucleótidos (5 µg/µl) y se incubó a 70°C durante 10 minutos. A continuación se dejó enfriar en hielo durante 5 minutos y se añadieron 6 µl de solución 5xRT (Stratagene), 3 µl de solución 0,1 M de DTT (Stratagene), 0,5 µl de inhibidor de RNasa (40 U/µl), 1,5 µl de reverso transcriptasa (SuperscriptII; Stratagene) y 0,6 µl de una solución madre de dNTPs que incluía dUTP amino modificado (25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 5 mM dTTP y 20 mM aa-dUTP). Los componentes de la reacción se mezclaron y se mantuvieron durante una hora a 42°C. Transcurrido este tiempo se añadió 1 µl más de reverso transcriptasa (SuperscriptII; Stratagene) y se dejó transcurrir la reacción durante otra hora hasta la obtención de la muestra final de ADNc.

12.2. Hidrólisis del ARN

Se incorporaron a la muestra 15 μ l de NaOH 0,2 M, se mezcló bien y se incubó a 70°C durante 10 minutos. A continuación se neutralizó el pH añadiendo 15 μ l de HCl 0,2 M y se procedió a limpiar el ADNc utilizando columnas CyScribe GFX (Amersham Biosciences). Para ello se mezcló la muestra con 450 μ l de tampón de captura y se aplicó a una columna CyScribe GFX que se centrifugó a 13.000xg durante 30 segundos. Se lavó la columna 2 veces con 600 μ l de etanol al 80% y se centrifugó luego una vez más a 13.000xg durante 10 segundos para eliminar restos de líquido. Se colocó la columna en un nuevo tubo y se añadieron 60 μ l de bicarbonato sódico 0,1 M a pH 9. Se incubó a temperatura ambiente 5 minutos y luego se centrifugó a 13.000xg durante 1 minuto para recuperar el ADNc. Según las recomendaciones del fabricante, se procedió inmediatamente al marcaje de la muestra (siguiente apartado).

12.3. Marcaje del ADNc

El ADNc se marcó utilizando como fluoróforo Cy3 para las condiciones control y Cy5 para las condiciones de estudio. Tanto los fluoróforos como las muestras marcadas se mantuvieron protegidos de la luz en la medida de lo posible a lo largo de todo el proceso.

Los fluoróforos de Amersham se disolvieron en 10 μ l de DMSO (es importante que el DMSO no contenga agua) y se separaron 10 alícuotas de 1 μ l del fluoróforo que se desecaron en “Speed-vac” y se conservaron a -20°C en bolsas selladas con un paquete de silica gel para evitar su hidratación.

Para llevar a cabo una reacción de marcaje se transfirió la muestra a un microtubo con una alícuota del fluoróforo correspondiente y se resuspendió pipeteando. Alternativamente se puede añadir 1 μ l del fluoróforo recién resuspendido en DMSO y pipetear hasta obtener una suspensión homogénea. Se dejaron transcurrir entre 1 y 2 horas manteniendo la suspensión a temperatura ambiente en oscuridad y a continuación se procedió a neutralizar los fluoróforos que pudieran haber quedado libres añadiendo 4,5 μ l de hidroxilamina 4 M, mezclando

suavemente y dejando la mezcla 15 minutos más a temperatura ambiente en oscuridad.

Las muestras marcadas con Cy3 y Cy5 que constituían una sonda se mezclaron en este momento y se purificaron juntas utilizando el CyScribe GFX Purification Kit (Amersham Biosciences) según las instrucciones del fabricante. La muestra marcada con Cy5 se mezcló con 600 µl de Solución de Captura y luego se añadió la muestra marcada con Cy3. Tras pipetear repetidas veces para obtener una mezcla homogénea, ésta se aplicó a una columna CyScribe GFX. Se centrifugó la columna a 13.000xg durante 30 segundos y se eliminó el eluido. Se lavó la columna 2 veces con 600 µl de Solución de Lavado y se centrifugó luego a 13.000xg durante 10 segundos para eliminar restos de líquido. Se colocó la columna en un nuevo microtubo y se añadieron 60 µl de Solución de Elución. Se incubó a temperatura ambiente 5 minutos y luego se centrifugó a 13.000xg durante 1 minuto para recuperar el ADNc marcado. El ADNc marcado de esta forma puede mantenerse a -20°C hasta el momento de su utilización.

12.4. Procesamiento del microarray previo a la hibridación

Los Sm6kOligo microarrays que se utilizaron son cristales QMT con grupos epoxi a los que se unen los oligonucleótidos. De este modo se imprimen sobre el cristal 20160 gotas que representan todos los ORFs contemplados en la anotación de *S. meliloti* 1021 (Galibert *et al.*, 2001) por triplicado (en algunos casos se imprimieron hasta 16 réplicas).

Estos cristales deben ser procesados antes de la hibridación para bloquear los grupos epoxi libres. Para ello se lavaron durante 5 minutos a temperatura ambiente en Solución 1 (25 µl de Triton X100 en 25 ml de agua MilliQ, disolver calentando 5 minutos a 80°C y dejar enfriar a temperatura ambiente antes de usar), luego se lavaron dos veces durante 2 minutos a temperatura ambiente en Solución 2 (50 µl de HCl 37% en 50 ml de agua MilliQ), se mantuvieron durante 10 minutos a temperatura ambiente en Solución 3 (2,5 ml KCl 1 M en 22,5 ml de agua MilliQ), se aclararon 1 minuto en agua MilliQ a temperatura ambiente y se transfirieron a la Solución de Bloqueo (15 ml de agua MilliQ, 4 µl de HCl 37% y 5 ml de 4xQMT

Blocking Solution) que se preparó en el momento y se precalentó a 50°C antes de su uso. Los cristales se mantuvieron en la Solución de Bloqueo a 50°C durante 15 minutos en un contenedor de cristal, se aclararon 1 minuto en agua MilliQ a temperatura ambiente y finalmente se secaron por centrifugación a 1.200 r.p.m. durante 3 minutos.

12.5. Hibridación de los Sm6kOligo microarrays usando un cubreobjetos y una cámara de hibridación

Las muestras de ADNc marcado se desecaron utilizando un “Speed-vac” y se resuspendieron en 50 µl de DIG Easy Hyb pipeteando varias veces. Se adicionó 1 µl de ADN sonificado de esperma de salmón y se incubó a 65°C durante 5-10 minutos.

Los cristales pretratados según las instrucciones del apartado anterior se colocaron a 42°C en las cámaras de hibridación para evitar posibles precipitaciones debidas a gradientes térmicos. La sonda se aplicó como una gota sobre el cristal y se colocó el cubreobjetos de modo que no quedasen burbujas. Se cerró la cámara de hibridación y, una vez sellada, se introdujo en un baño a 42°C durante 14-18 horas.

12.6. Hibridación de los Sm6kOligo microarrays usando una estación de hibridación automática

Las muestras de ADNc marcado se desecaron utilizando un “Speed-vac” y se resuspendieron en 247 µl de DIG Easy Hyb pipeteando varias veces. Se adicionaron 3 µl de ADN sonificado de esperma de salmón y se incubó a 65°C durante 5-10 minutos.

Los cristales pretratados según las instrucciones del apartado 11.4. se colocaron en las cámaras de la estación de hibridación y la sonda se aplicó utilizando una jeringa Hamilton. La cámara se mantuvo a 42°C durante 14-18 horas con una ligera agitación de la sonda sobre el cristal.

12.7. Procesamiento del microarray tras la hibridación

Transcurrido el tiempo necesario para la hibridación, los cristales se lavaron primero con una solución 2xSSC y SDS al 0,2% (p/v) durante 5 minutos a 42°C, luego dos veces con una solución 0,2xSSC y SDS al 0,1% (p/v) durante 1 minuto a temperatura ambiente, otras dos veces con una solución 0,2xSSC durante 1 minuto a temperatura ambiente y finalmente una vez con una solución 0,1xSSC preenfriada a 18°C durante 1 minuto. Por último, los cristales se secaron por centrifugación a 1.200 r.p.m. durante 3-5 minutos y se dejaron a temperatura ambiente un mínimo de 20 minutos más antes de escanearlos. Durante todo el proceso se mantuvieron los cristales en oscuridad en la medida de lo posible.

12.8. Adquisición de la imagen y tratamiento de datos

Se utilizó un escaner confocal (ScanArray4000) para la obtención de las imágenes correspondientes a la utilización de los láseres de 555 nm y 647 nm para detección de la fluorescencia de Cy3 y Cy5, respectivamente. Para la obtención de los datos se utilizó el programa ImaGene5.5 (Biodiscovery Inc., Los Angeles, Calif., USA) que determinó la intensidad de los distintos puntos impresos en el cristal así como la intensidad del fondo asociado a cada punto y la calidad del punto (según su forma, tamaño, intensidad respecto al fondo,...). Se obtuvo el valor del \log_2 de la relación entre las intensidades detectadas de cada fluoróforo para cada punto (M) mediante la fórmula $M_i = \log_2 (R_i/G_i)$ siendo $R_i = I_{ch1i} - Bg_{ch1i}$ y $G_i = I_{ch2i} - Bg_{ch2i}$, donde I_{ch1i} o I_{ch2i} es la intensidad de un punto en el canal 1 o el 2 y Bg_{ch1i} o Bg_{ch2i} es la intensidad del fondo asociado al punto en el canal 1 o el 2, respectivamente. También se calculó la intensidad media para cada punto (A) según la fórmula $A_i = \log_2(R_i G_i)^{0,5}$. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado. Para la normalización de los datos y el análisis estadístico de las réplicas se utilizó el programa EMMA1.1 (Dondrup *et al.*, 2003) con el que se obtuvieron los correspondientes valores de M y A una vez normalizados y promediados en las réplicas con una calidad aceptable (n) junto con el valor de fiabilidad de estos datos (p) según una t de Student. Se consideraron como diferencialmente expresados aquellos genes para los que $n \geq 5$, $p \leq 0,05$, $A \geq 9$ y $M \geq 2$ o $M \leq -2$ (es decir, si su expresión variaba cuatro veces como

mínimo entre ambas condiciones experimentales) en al menos 2 de los 16 experimentos que se llevaron a cabo.

Para el análisis de agrupamiento se seleccionaron aquellos genes en los que $n \geq 5$, $p \leq 0,05$ y $A \geq 9$ en al menos un 80% de los 16 experimentos realizados. Dicho análisis se llevó a cabo utilizando los programas Cluster3.0 y Java Tree View.

13. ENSAYOS CON PLANTAS

13.1. Esterilización de semillas y germinación

Las semillas de alfalfa (*Medicago sativa* L. variedad *Aragón*) se sumergieron en HgCl_2 al 2,5% durante 9,5 minutos en agitación. A continuación se lavaron 5 veces con agua destilada estéril en condiciones axénicas y se dejaron en imbibición durante un mínimo de una hora y media. Luego se lavaron 2 veces más con agua destilada estéril y se repartieron en placas de Petri que contenían un papel de filtro humedecido con 3 ml de agua destilada estéril y finalmente se dejaron a 28°C en oscuridad durante 24 horas.

Las semillas de *Lotus tenuis* se escarificaron mediante inmersión en ácido sulfúrico durante 3-5 minutos. A continuación se lavaron 5-10 veces con agua destilada estéril antes de proceder a su desinfección. Las semillas escarificadas se mantuvieron sumergidas en lejía al 5% durante 2-3 minutos en agitación y posteriormente se enjuagaron 5-10 veces con agua destilada estéril. Las semillas así tratadas se dejaron en imbibición una media hora antes de colocarlas sobre placas de agar-agua (1%) y dejarlas a 28°C en oscuridad durante 48 horas.

13.2. Solución nutritiva para el cultivo de plantas

Para el cultivo de plantas se utilizó la solución de Rigaud y Puppo (1975), modificada:

-Macroelementos:	KH ₂ PO ₄	68 mg/l
	K ₂ HPO ₄	44 mg/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	123 mg/l
	K ₂ SO ₄	174 mg/l
	CaSO ₄	173 mg/l
	EDTA Férrico (Secuestreno)	50 mg/l
-Microelementos:	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,11 mg/l
	H ₃ BO ₃	2,85 mg/l
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	3,07 mg/l
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,55 mg/l
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,2 mg/l

El pH de la solución se ajustó a 7,5 y se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

13.3. Cultivo axénico de plantas

13.3.1. Cultivo axénico en tubos

El cultivo axénico de plantas de alfalfa se llevó a cabo según la técnica descrita por Olivares y colaboradores (1980). Cuando las plántulas de alfalfa recién germinadas alcanzaron aproximadamente 1 cm de longitud, se colocaron en tubos de 20 x 200 mm que contenían 10 ml de solución nutritiva sin nitrógeno y un soporte de papel de filtro. Se dejaron los tubos en oscuridad durante 2-3 días. A continuación, para evitar la incidencia directa de la luz sobre las raíces, la parte inferior de los tubos se cubrió con papel opaco y se llevaron a la cámara de cultivo de plantas en las siguientes condiciones: 500 μ einstein x m⁻² x s⁻¹ (λ = 400-700 nm) de intensidad lumínica, fotoperiodo de 15/9 horas luz/oscuridad, 24/18°C de temperatura día/noche y 50% de humedad relativa.

Transcurridos 7-10 días en la cámara, se inoculó cada tubo con 1 ml de una suspensión celular de aproximadamente 10⁷ células/ml de la cepa en estudio.

13.3.2. Cultivo en jarras Leonard

Una vez germinadas las semillas, se plantaron en jarras Leonard (Leonard, 1943). Las jarras Leonard se prepararon rellenando el componente superior con vermiculita y el inferior con solución nutritiva sin nitrógeno y esterilizando ambos en autoclave a 120°C durante 20 minutos. En cada jarra se sembraron 8 plántulas que se inocularon en el momento de la siembra con 1 ml de una suspensión celular de 10^8 - 10^9 células/ml de la cepa en estudio.

Las plántulas se cubrieron entonces con una capa de perlita estéril para evitar una posible contaminación ambiental o un calentamiento excesivo que pudiera alterar el desarrollo. La juntura entre el componente superior y el inferior de la jarra se selló con papel parafilm y las jarras se envolvieron en papel opaco para evitar que la luz incidiera sobre las raíces.

Las jarras Leonard así preparadas se trasladaron a una cámara de plantas en las condiciones indicadas en el apartado anterior. La cosecha se llevó a cabo unas 7 semanas después de la inoculación, cuando aún no habían florecido. Para regarlas se utilizó alternativamente agua o solución nutritiva sin nitrógeno autoclavadas y todo el proceso se llevó a cabo en cámara de flujo laminar para evitar contaminaciones.

13.3.3. Medida del grado de infectividad

Se inocularon 24 tubos preparados como se describe en el apartado 11.3.1. con las cepas en estudio. Tras la inoculación se registró diariamente el número de plantas noduladas y el número de nódulos formados por cada planta. El seguimiento de la nodulación se continuó hasta pasadas 4-5 semanas de la inoculación.

13.3.4. Determinación de la actividad reductora de acetileno (A.R.A.)

Se tomaron las raíces de 6 plantas cultivadas en tubo o hasta 4 plantas cultivadas en jarras Leonard para cada determinación. En el caso de las plantas cultivadas en jarras Leonard, las raíces se lavaron en la medida de lo posible para eliminar restos de vermiculita y luego se secaron ligeramente colocándolas unos segundos sobre papel de filtro. Se introdujeron estas raíces en matraces de 100 ml que se sellaron con tapones de goma y en los que se sustituyó el 10% del volumen de aire (10 ml)

por acetileno. El acetileno se obtuvo haciendo reaccionar unos 2,5 g de carburo de calcio con 35 ml de agua. Esta es una reacción exotérmica que libera hidróxido de calcio y acetileno. La reacción se dejó transcurrir unos 15 segundos antes de sellar el bote y proceder a inyectar acetileno en los matraces. Se tomaron muestras a los 10 y 20 minutos de la adición del acetileno y el contenido de etileno en cada una de ellas se determinó por cromatografía.

La determinación de etileno se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases HP5890. La cantidad de etileno se calculó interpolando el área del pico obtenido (con un tiempo de retención de unos 2,2 minutos) en una curva patrón que se preparó con etileno puro. Conociendo el volumen del matraz y el número de nódulos de cada muestra, se estableció la actividad reductora de acetileno en nmoles de etileno producidos por hora y nódulo.

13.3.4. Determinación de la competitividad

Se inocularon 12 tubos preparados como se describe en el apartado 12.3.1 con una mezcla 1:1 de la cepa a estudiar (derivada de 1021) y 1021 pGUS3. En cada experimento se incluyeron como control 12 tubos inoculados con una mezcla 1:1 de 1021 y 1021 pGUS3. 15 días después de la inoculación se cortaron las raíces, se aclararon ligeramente con agua destilada y se mantuvieron 24 horas a 37°C sumergidas en 7 ml de una solución de X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucuronido) (21 mg / 40 ml) en tampón fosfato sódico 50 mM a pH 7 y 1% de SDS. Pasado este tiempo, los nódulos que contenían 1021 pGUS3 o estaban ocupados por ambas cepas aparecieron teñidos de azul mientras que aquellos ocupados exclusivamente por la cepa de interés permanecieron blancos. Se pudo establecer así la relación entre la capacidad de ocupación de los nódulos de la cepa en estudio y su parental con respecto a la 1021 pGUS3, comparando el porcentaje de ocupación de la cepa silvestre (1021) en la mezcla control con el de la cepa en estudio (derivada de 1021) en la mezcla problema.

Resultados y Discusión:
Capítulo 1

1. ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS EN EL TRANSCRIPTOMA DE *Sinorhizobium meliloti* EN RESPUESTA A UN CHOQUE OSMÓTICO

Como hemos visto, los rizobios pueden utilizar distintos mecanismos de adaptación cuando se exponen a estrés por elevadas concentraciones de solutos en el medio (Miller y Wood, 1996; Zahran, 1999). Sin embargo, la respuesta adaptativa a los estreses ambientales es un fenómeno complejo que incluye muchos procesos fisiológicos y bioquímicos. Dichos procesos son el resultado de cambios en la actividad de diversas enzimas y sistemas de transporte y de variaciones en la expresión génica (Djordjevic *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2004).

Se han utilizado microarrays de *S. meliloti* para determinar los cambios en la expresión génica en respuesta a algunos estreses abióticos (Krol & Becker, 2004; Rüberg *et al.*, 2003). Rüberg y colaboradores (2003) determinaron que la exposición prolongada a NaCl provocaba en *S. meliloti* la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos, la captación de hierro, la motilidad y la quimiotaxis y la activación de genes relacionados con la biosíntesis de polisacáridos y el transporte de pequeñas moléculas (aminoácidos, aminos, péptidos, aniones y alcoholes).

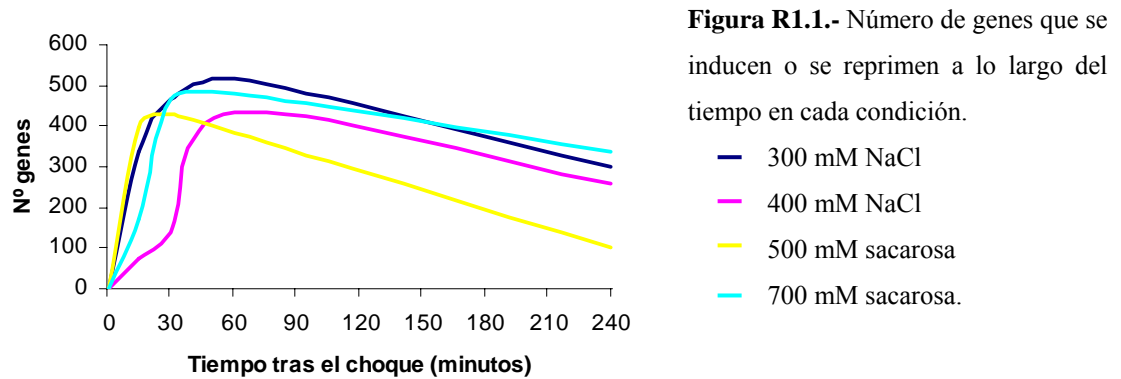
En este trabajo, se pretende obtener una visión más detallada de la respuesta temprana de *S. meliloti* a un choque osmótico. Para ello, consideramos primero la utilización de dos compuestos diferentes como estresantes: NaCl y sacarosa. La respuesta a un estrés salino y la respuesta a un estrés osmótico se diferencia raras veces en la literatura. Sin embargo, se sabe que estas condiciones pueden ser reconocidas como dos estímulos ambientales distintos por algunos organismos (Han *et al.*, 2005; Kanesaki *et al.*, 2002). Por otra parte, la respuesta a cualquier estrés suele dividirse en dos fases: una reacción inicial que se produce ante la exposición brusca a la situación de estrés y una segunda etapa de adaptación celular al crecimiento en esa condición. Es, por tanto, interesante determinar no sólo los cambios persistentes en el perfil de expresión de los genes en células que crecen sometidas a un estrés, sino también los

cambios que se producen a lo largo del tiempo durante la primera etapa tras la exposición a dicho estrés.

Para estudiar los cambios en la expresión génica que se producen como respuesta a un choque hiperosmótico en *S. meliloti*, se utilizaron microarrays Sm6kOligo (Krol y Becker, 2004). En primer lugar se llevó a cabo un experimento control en el que se obtuvieron sondas de ADNc marcadas con Cy3 y Cy5 a partir de ARN extraído de cultivos crecidos en medio mínimo hasta una D.O._{600nm} de 0,4. Puesto que los cultivos se trataron del mismo modo, se esperaba que no hubiera genes cuya expresión variase entre las dos condiciones. De todos los genes del genoma de *S. meliloti*, sólo 3 presentaron valores de M (\log_2 de la relación entre la expresión en ambas condiciones) superiores a 2 o inferiores a -2. Este resultado sugería que podían considerarse como inducidos o reprimidos aquellos genes para los que M era mayor que 2 o menor que -2. En los experimentos que se describen a continuación, se consideraron diferencialmente expresados aquellos genes para los que concurrían estas circunstancias en al menos 2 de los 16 experimentos que se llevaron a cabo.

Se utilizaron dos concentraciones de NaCl (0,3 M o 0,4 M) y sacarosa (0,5 M o 0,7 M) para inducir estrés hipersalino e hiperosmótico, respectivamente. Para cada una de las cuatro condiciones descritas, los cambios en los niveles de expresión génica se monitorizaron 15, 30, 60 y 240 minutos después del choque que se impuso cuando el cultivo alcanzó una D.O._{600nm} de 0,4. Un total de 1.003 genes (el 16% de los genes anotados en el genoma de *S. meliloti* 1021) fueron finalmente considerados como diferencialmente expresados.

El número de genes inducidos o reprimidos en las distintas condiciones ensayadas aumentó a lo largo del tiempo hasta alcanzar un máximo 30 o 60 minutos después del choque osmótico, para disminuir posteriormente (Fig. R1.1).



Se observó el mismo comportamiento en los valores medios de inducción y represión de los genes diferencialmente expresados a lo largo del tiempo, lo que indica que la mayoría de estos genes mostraba una respuesta transitoria al choque osmótico (Fig. R1.2).

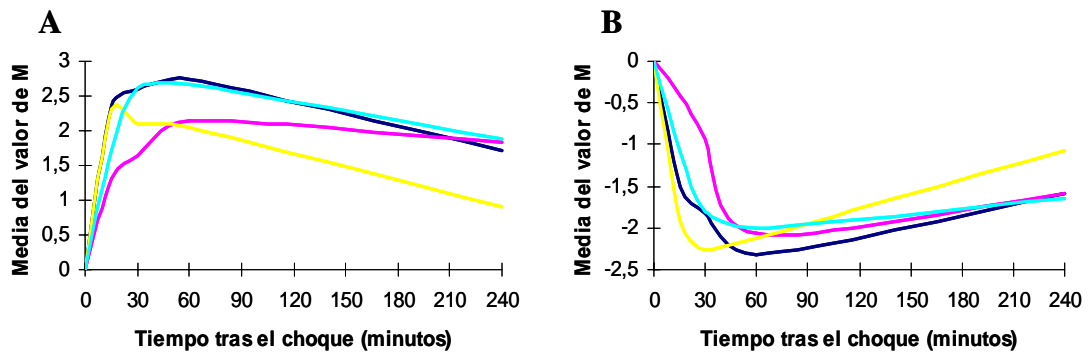


Figura R1.2.- Valores medios de inducción (A) y represión (B) según el valor de M a lo largo del tiempo.

- 300 mM NaCl; — 400 mM NaCl; — 500 mM sacarosa; — 700 mM sacarosa.

De los 1.003 genes diferencialmente expresados, 539 fueron genes inducidos y 444 reprimidos. Los 20 genes restantes aparecían como inducidos o reprimidos según el momento. Más del 40% de los genes diferencialmente expresados formaban parte de supuestos operones en los que dos o más genes aparecían osmorregulados en nuestras condiciones experimentales.

Se observó una fuerte desviación en la distribución entre los distintos replicones de *S. meliloti* 1021 de los genes que respondieron a estrés osmótico en estas condiciones (Fig. R1.3).

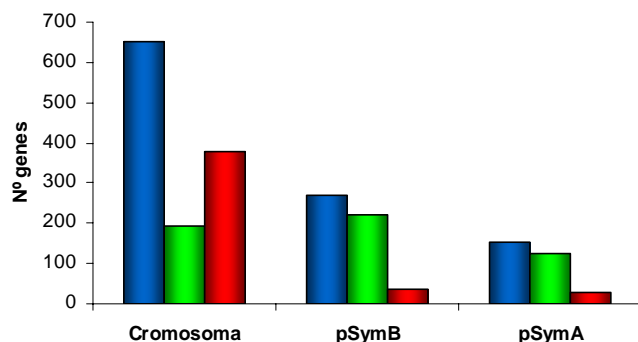


Figura R1.3.- Distribución de genes inducidos (rojo) y reprimidos (verde) en los tres replicones de *S. meliloti* 1021. En azul se representa el total de genes diferencialmente expresados en cada replicón.

Hasta 346 (64%) de los genes inducidos se encontraban localizados en los megaplásmidos, lo que representa 1,4 veces más genes de lo esperado, ya que el 46% de los genes anotados en el genoma de *S. meliloti* 1021 son plasmídicos y el 54%, cromosómicos. Por otra parte, 378 (85%) de los genes reprimidos estaban localizados en el cromosoma, lo que representa 1,6 veces más genes de lo esperado. Esta distribución en replicones es semejante a la observada para genes diferencialmente expresados en bacteroides o en células en vida libre que sobreexpresan *nodD3* (Barnett *et al.*, 2004).

Esta evidente desviación en la distribución en replicones de los genes diferencialmente expresados respecto a lo esperado se encuentra también respaldada por la respuesta diferencial que presentan distintos alelos de un mismo gen según su localización. Por ejemplo, los genes *glg* plasmídicos se encontraban inducidos mientras que los cromosómicos no alteraron sus niveles de expresión. En el caso de los genes *nuo*, ocurre justamente al contrario: se observó una represión del operón cromosómico mientras que no se apreciaron cambios en la expresión del plasmídico. De hecho, el 83% de los genes diferencialmente expresados localizados en el plásmido pSymB, se encontraban inducidos respecto a las condiciones control. Esta inducción preferente de los genes plasmídicos, y particularmente de los localizados en el pSymB, podría ser una indicación de la implicación de este plásmido en la adaptación a estrés osmótico de *S. meliloti*, hecho que ha sido corroborado en nuestro grupo de investigación (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006).

Un aumento de la osmolaridad del medio provoca una salida de agua de la célula que conduce a una reducción de la presión de turgor y a la deshidratación del

citoplasma, con el consiguiente incremento de la concentración iónica (Sleator y Hill, 2001). La adición de elevadas concentraciones de NaCl al medio de cultivo conduce a una hipertonicidad parecida. En consecuencia, es lógico esperar que el estrés hipersalino y el estrés hiperosmótico tengan efectos semejantes sobre la transcripción génica.

En este estudio, se confirmaron dichas expectativas: la gran mayoría de los genes respondían a ambos estreses. Sólo 105 de los 1003 genes respondieron exclusivamente a la adición de NaCl (no se consideraron inducidos o reprimidos en ninguno de los experimentos llevados a cabo utilizando sacarosa) mientras que 112 genes respondieron exclusivamente a la adición de sacarosa. Por otra parte, 38 genes (18%) de los 217 que aparentemente presentaron una respuesta exclusiva a uno de los compuestos estresantes, formaban parte de supuestos operones con genes diferencialmente expresados en respuesta a ambos compuestos por lo que es probable que muchos de estos genes respondan a los dos tipos de estrés y que el hecho de que no se hayan detectado en algunos casos se deba simplemente a una limitación técnica.

De acuerdo con la secuencia del genoma de *S. meliloti* (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/annotation/iANT/bacteria/rhime/index.html>), una gran fracción de los genes inducidos son genes de función desconocida o que presentan una homología global o parcial con genes depositados en las bases de datos (Fig. R1.4).

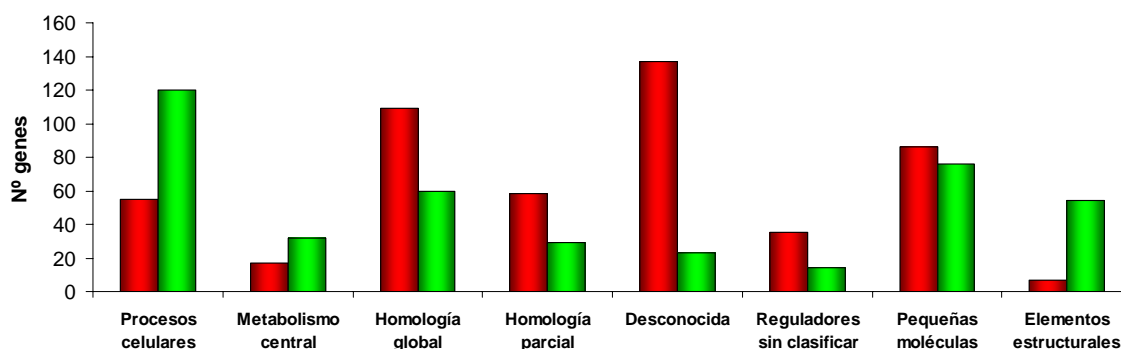


Figura R1.4.- Categorías funcionales en que se distribuyen los genes que se inducen (rojo) o reprimen (verde) tras un choque hiperosmótico.

De los 428 genes que se inducen en respuesta a ambos estreses, 278 (65%) eran de función desconocida o hipotética y es especialmente interesante la presencia entre ellos

de 29 genes consignados como reguladores sin clasificar. Esta gran proporción de proteínas de función desconocida indica que una parte significativa de las reacciones celulares en respuesta a condiciones de hiperosmolaridad o salinidad aún está por explorar. A diferencia de los genes inducidos en nuestro estudio, la mayoría de los genes cuya expresión disminuye en respuesta a estrés se encuentran distribuidos en categorías funcionales definidas (Fig. R1.4). Este tipo de genes se relacionan en su mayor parte con la ralentización del crecimiento celular y la disminución de la biosíntesis de proteínas que son características de las células estresadas.

1.1. Metabolismo energético y carbonado

Cuando la osmolaridad de un cultivo de *Escherichia coli* que está creciendo en medio mínimo aumenta sustancialmente y de modo abrupto, las células pierden agua y se plasmolizan casi instantáneamente, la síntesis de macromoléculas se inhibe y la tasa de respiración disminuye (Houssin *et al.*, 1991). En *S. meliloti* se observó una inhibición de muchas funciones del metabolismo central y los sistemas de producción de energía tras un choque osmótico. El ciclo de los ácidos tricarbónicos se encontraba claramente reprimido (*sdhBD*, *mdh*, *sucABCD*, *pckA*) junto con varias enzimas glucolíticas (*cbbA*, *pdhB*, *pgi*). La represión de genes relacionados con la captación (*smoEFGK*) y el metabolismo (*smoS*, *mtlK*, *cbbA*, *xylA*) del manitol, la fuente de carbono suplementada en los experimentos realizados, indicaba una ralentización del metabolismo general. En relación con este hecho, se observó la represión de distintos complejos de la cadena respiratoria y funciones asociadas: *nuoA1C1D1E1G1HJK1LMN*, *fbcBC*, *ctaBDE*, *rrpP*, *ppa* y *atpABDF2GH*.

En muchas bacterias, el carbono se acumula en forma de glucógeno en condiciones que limitan el crecimiento. Este polisacárido puede ser utilizado como fuente de energía durante la fase de crecimiento estacionaria para prolongar la viabilidad celular. Por otra parte, se sabe que el operón responsable de la acumulación de glucógeno en *Yersinia pestis* se induce en respuesta a estrés hiperosmótico, lo que llevó a la hipótesis de que la acumulación de dicho compuesto podría ayudar a restaurar el volumen citoplasmático tras un choque osmótico (Han *et al.*, 2005). En *S. meliloti* se observó un aumento de los

niveles de expresión de *glgA2*, *glgB2* y *glgX2*, tres genes implicados en el metabolismo del glucógeno que se encuentran localizados en el plásmido pSymB. Sin embargo, la expresión de los correspondientes alelos cromosómicos no se vio afectada.

Muchos genes relacionados con la captación de metales aparecieron reprimidos tras un choque osmótico. La expresión de varios genes *sit* (*sitA*, *sitB*, *sitC* y *sitD*) disminuyó tras la adición de sacarosa y el primer gen del operón (*sitA*) se reprimió además por la adición de NaCl. Estos genes participan fundamentalmente en la captación de manganeso, aunque se sabe que pueden intervenir en la captación de hierro (Davies y Walker, 2007). También se observó represión de genes relacionados con la síntesis y regulación del sideróforo rizobactina 1021: *rhbA*, *rhbB*, *rhbC*, *rhbE*, *rhbF*, *rhtA* (Lynch *et al.*, 2001) y SMA2339; así como de genes de transportadores de hierro en la forma de sideróforos (*exbB*, *exbD*), genes de un transportador de compuestos asociados a grupos hemo (*hmuS*, *hmuT*) y otros genes posiblemente relacionados con la captación de hierro (SMA1746, SMC00784, SMC02726, SMB21432). La represión de la mayoría de estos genes durante el crecimiento de *S. meliloti* en condiciones de elevada salinidad ha sido descrita con anterioridad (Rüberg *et al.*, 2003).

1.2. Metabolismo proteico

De los 105 genes que respondieron exclusivamente a la adición de NaCl, 56 se reprimieron tras el choque. 25 de esos 56 genes codificaban proteínas ribosómicas. Además, en este mismo grupo había dos genes presentes en uno de los operones ribosómicos (*tufA* y *fusA1*) que probablemente codifican factores de elongación. Otras 6 proteínas ribosómicas y otro factor de elongación (*tufB*) están codificados por genes reprimidos en respuesta a sacarosa y NaCl. Por otra parte, se observó una inducción en respuesta a sacarosa de *rbfA*, un gen que codifica un factor de unión al ribosoma implicado en la maduración del ARN ribosómico (Xia *et al.*, 2003). También la expresión de *ftsJ* se incrementó tras la adición de NaCl o sacarosa. FtsJ es una metiltransferasa de ARN ribosómico 23S cuya mutación provoca una reducción en la estabilidad de los ribosomas y una disminución en la tasa de transcripción de *E. coli* (Caldas *et al.*, 2000). Por último, se pudo apreciar una inducción de *hemK1* en respuesta

a ambos compuestos. El producto de este gen se encuentra implicado en la metilación de factores de liberación, de modo que tiene una importante función en la terminación de la traducción. Los mutantes de *E. coli* en el gen *hemK* presentan graves deficiencias de crecimiento y una tasa incrementada de lectura de codones sin sentido (Nakahigashi *et al.*, 2002). Estos datos sugieren que a pesar de que existe una inhibición general de la síntesis proteica tras un choque osmótico, resulta necesario mantener un alto grado de precisión durante el proceso de traducción.

Curiosamente, entre los resultados obtenidos, se observó la represión del gen *tig* por adición de NaCl al medio. Tig es una proteína asociada al ribosoma que combina la catálisis de la isomerización de grupos peptidil-prolilo con actividades de tipo chaperona en *E. coli*. Se sabe que este factor coopera con la maquinaria de la chaperona DnaK (Hsp70) durante el plegamiento de proteínas recién sintetizadas (revisado por Hartl y Hayer-Hartl, 2002) y hay estudios proteómicos que identifican Tig como una proteína cuya concentración aumenta en respuesta a estrés en *S. meliloti* (Djordjevic *et al.*, 2003). En nuestro estudio, los genes de las chaperonas *groESL1* y *groESL2* se reprimieron tanto por el estrés hipersalino como por el hiperosmótico. Estas chaperonas son conocidas como proteínas de choque térmico que intervienen en el plegamiento de proteínas desnaturalizadas. Sin embargo, también se encuentran implicadas en el plegamiento de la cadena polipeptídica durante el proceso de traducción, así como durante la secreción proteica.

La represión de genes de chaperonas resulta una respuesta inesperada ante la imposición de una condición de estrés aunque podría tratarse de un fenómeno transitorio que se diera en una etapa temprana tras el choque osmótico y que se relacionase con la reducción de la síntesis proteica que hemos observado. De hecho, varias chaperonas que no actúan en asociación con los ribosomas se indujeron tras la adición de NaCl y sacarosa: ClpB, DegP e IbpA. ClpB es una proteasa que actúa en la disolución de agregados proteicos inactivos que se acumulan durante la exposición a estrés (Zolkiewski, 1999; Goloubinoff *et al.*, 1999). Este gen también se induce en *Synechocystis* en condiciones de alta salinidad o estrés hiperosmótico (Kanesaki *et al.*, 2002); DegP parece conferir capacidad de supervivencia y resistencia a estrés oxidativo

y a elevadas temperaturas en varios microbios patógenos (revisado en Raivio, 2005), mientras IbpA es una pequeña proteína de choque térmico que, en asociación con IbpB, actúa estabilizando proteínas agregadas térmicamente y desagregándolas para devolverlas a su estado competente en *E. coli* (Lund, 2001).

1.3. Replicación y envueltas celulares

Se observó inducción del gen *maf* tras la adición de NaCl. Este gen también se induce en respuesta a salinidad aunque no a sorbitol en *Synechocystis* (Kanesaki *et al.*, 2002). En *Bacillus subtilis* la sobreexpresión del gen *maf* provoca inhibición del proceso de septación, lo que conduce a una filamentación extensiva (Butler *et al.*, 1993). La inducción de *maf* sugiere una inhibición de la división celular probablemente asociada a la respuesta general a estrés osmótico ya que también se detectó represión de *ftsZ1* en respuesta a la adición de NaCl o sacarosa. De hecho, se produjo represión de genes relacionados con la replicación y segregación cromosómica en respuesta a la adición de sacarosa (*smc*, *ftsK*) o de ambos compuestos estresantes (*dnaN*, *dnaA*, *ruvA*).

En contraste con los genes relacionados con la formación de otras estructuras superficiales, Rüberg y colaboradores (2003) observaron que la respuesta osmoadaptativa en *S. meliloti* incluía la inducción de genes relacionados con la producción de succinoglucano. Entre estos genes, se pudo observar una inducción temprana de los genes *exoHK* tras un choque osmótico. *S. meliloti* tiene la capacidad de producir dos tipos de exopolisacáricos: EPS-I (succinoglucano) y EPS-II (galactoglucano). *S. meliloti* produce succinoglucano en formas de bajo peso molecular (LMW) y de alto peso molecular (HMW). El gen *exoK* de *S. meliloti* codifica una endoglucanasa que despolimeriza específicamente el succinoglucano naciente para producir formas de bajo peso molecular pero no actúa sobre el succinoglucano que se encuentra acumulado en el sobrenadante. Además, se produjo una inducción del gen *eglC* que codifica una endoglucanasa que también contribuye a la despolimerización del succinoglucano (Sharypova *et al.*, 1999). La adición de grupos succinilo al EPSI, catalizada por ExoH, parece un requerimiento previo a la acción de estas endoglucanasas (York y Walker, 1998). Por otra parte, se observó una represión del gen

mucR. MucR es un regulador transcripcional esencial para la producción de las formas de alto peso molecular del succinoglucano (Bohin, 2000) y también está implicado en la represión de la transcripción de genes *exp* y en consecuencia, de la producción de galactoglucano en *S. meliloti* (Bohin, 2000). Estos datos sugieren que la respuesta inicial a un choque osmótico incluye la modificación del patrón de síntesis de polisacáridos extracelulares de tal modo que se incentiva la producción de succinoglucano de bajo peso molecular y de galactoglucano.

El gen *rkpA* se reprimió por la adición de sacarosa y el gen *rkpK* en respuesta a sacarosa y NaCl. Estos genes se encuentran implicados en la producción del polisacárido capsular (KPS) que puede reemplazar al EPS durante el proceso de infección (Reuhs *et al.*, 1995). Los genes *rkpA-J* y *rkpK* actúan en la síntesis de KPS (Kereszt *et al.*, 1998), pero *rkpK* también es necesario para la síntesis del ácido UDP-galacturónico que se utiliza durante la producción de lipopolisacárido (LPS). Aunque se pudo observar una inducción temprana y transitoria del gen *wzy* (para la síntesis del antígeno O) tras un choque osmótico, también se produjo una represión del sistema de transporte Tol (genes *tolBCQR* y *pal*) implicado en la internalización de determinadas moléculas (junto con el sistema Exb, que también se encuentra reprimido) y necesario para la correcta expresión del antígeno O que se ensambla de modo dependiente de la polimerasa Wzy. TolA y posiblemente Pal podrían tener un papel en la modulación de la expresión en la superficie del antígeno O mediante el procesamiento de las subunidades de antígeno, ya sea durante la traslocación a través de la membrana o durante el ensamblaje del LPS en el periplasma. Se sabe que la ausencia de TolA y Pal induce una respuesta extracitoplasmática a estrés sostenida que provoca una reducción de la polimerización del antígeno O sin afectar a la estabilidad de la polimerasa Wzy (Vinés *et al.*, 2005). La represión de los genes *tol* y *pal* puede estar en consonancia con la represión de genes de varios sistemas de transporte como *smoEFGK* para la captación de sorbitol y manitol, *appJMPQ* y *livFHK* para el transporte de aminoácidos, genes implicados en el transporte de hierro (descritos previamente) o en la captación de poliaminas (descritos más adelante). A pesar de la inducción de *wzy*, la biosíntesis de LPS probablemente se ralentiza tras un choque osmótico como parece indicar la

represión por sacarosa de *uppS*, implicado en la biosíntesis de undecaprenil pirofosfato (Und-PP). El Und-PP actúa como un transportador lipídico en la transferencia de grupos glucosilo durante la biosíntesis de diversos polisacáridos bacterianos incluyendo el LPS. Este gen también se encuentra reprimido en respuesta a estrés hiperosmótico, aunque no por NaCl, en *Y. pestis* (Han *et al.*, 2005).

También en relación con las envueltas celulares, se observó represión de los genes relacionados con la síntesis de peptidoglucano (*murACG*) y con el transporte de β -glucanos cíclicos periplásmicos (*ndvA*) que se acumulan en respuesta a un descenso de la osmolaridad externa (revisado por Bohin, 2000), además de una inducción de la sintasa de fosfolípidos de ácidos grasos de ciclopropano (*cfa2*). La principal modificación en la composición de los ácidos grasos de membrana en *Lactococcus lactis* tras la exposición a una osmolaridad elevada es un aumento en la cantidad de ácidos grasos de ciclopropano (Guillot *et al.*, 2000). En *E. coli*, la ciclopropanación parece implicada en la supervivencia a largo plazo de células que no se encuentran creciendo activamente y se asocia a menudo con estreses ambientales (revisado por Grogan y Cronan, 1997).

Hasta 27 genes implicados en quimiotaxis y motilidad celular redujeron su expresión tras un choque osmótico. Entre ellos encontramos genes relacionados con la biosíntesis del flagelo (*flaAB*, *flhA*, *fliEMP*, *flgBDEFGKEL*) y el gen regulador *flbT*, además de genes del motor flagelar *motABCD*. Entre los genes de quimiotaxis encontramos inhibidos *cheABDR* y *mcpTUXZ*. Estos resultados son consistentes con datos previos sobre la represión de genes de motilidad y quimiotaxis en *S. meliloti* por la exposición prolongada a condiciones de estrés salino (Rüberg *et al.*, 2003) y a un amplio rango de factores de estrés ambiental que influyen en la motilidad y la quimiotaxis en bacterias (revisado por Soutourina y Bertin, 2003).

1.4. Metabolismo en estrés

Varios de los genes sobreexpresados se habían descrito con anterioridad como genes de respuesta a estrés. Esta categoría incluye por ejemplo los genes *ndi* (*ndiA1*, *ndiA2* y *ndiB*), que se inducen en *S. meliloti* en condiciones de privación de oxígeno, nitrógeno o carbono, por estrés osmótico y durante la entrada en fase estacionaria (Davey y de Bruijn, 2000). También se detectó una inducción de genes relacionados con el estrés oxidativo como una posible dioxigenasa (SMa1814), el gen *sodC* (que codifica una cupro zinc superóxido dismutasa) y el *katC* (catalasa). Además, se inducen genes probablemente relacionados con virulencia en respuesta a un choque osmótico. Algunos ejemplos son *attA1* y *attA2* que actúan en la adhesión de *Agrobacterium tumefaciens* y dos marcos de lectura abierta consignados como posibles proteínas asociadas a virulencia que parecen constituir un operón (SMc04408 y SMc04881). Algunos genes inducidos pueden estar relacionados con procesos de reparación del ADN: se sobreexpresan dos posibles ADN ligasas (SMb20912 y SMb20008), una probable proteína relacionada con la ADN polimerasa (SMb21448), una posible ADN invertasa (SMc02287) y una probable exodesoxirribonucleasa de tipo III (*xthA1*).

Se pudo detectar una ligera inducción de un gen tipo *rpo* (SMb20592) tras la adición de sacarosa pero éste no fue el único factor sigma que se indujo ante un choque osmótico. De hecho, se produjo una consistente inducción de los genes *rpoE2*, *rpoE5* y *rpoH2* por sal y sacarosa. Se han identificado catorce posibles factores sigma en el genoma de *S. meliloti* (Galibert *et al.*, 2001). Dos de esos genes codifican proteínas tipo σ^{32} : *rpoH1* y *rpoH2* (Ono *et al.*, 2001; Oke *et al.*, 2001). Hay hasta 6 copias del gen *rpoE* en el genoma de *S. meliloti*. Cada una de esas copias tiene probablemente funciones específicas ya que observamos inducción de sólo dos de ellas (*rpoE2* y *rpoE5*) y represión de otra (*rpoE4*) como consecuencia del choque osmótico. RpoE es un factor sigma con función extracitoplasmática y podría ser incluso más importante en la supervivencia de *E. coli* durante la fase estacionaria que el factor RpoS (Yoon *et al.*, 2003). Los factores sigma de función extracitoplasmática son parte del regulón bacteriano de respuesta a estrés (Missiakas y Raina, 1998). Reaccionan ante señales procedentes del exterior de la membrana citoplásmica y están implicados en la

activación transcripcional de genes que codifican productos relacionados con procesos de defensa o reparación (Raivio y Silhavy, 2001).

Un incremento en la concentración iónica en el interior celular se traduce en la captación o la síntesis endógena de compuestos neutros que actúan como osmoprotectores, ya que pueden acumularse a elevadas concentraciones sin afectar negativamente a los procesos celulares (Zahran, 1999). En este estudio se detectó la inducción en respuesta a sal de un gen que codifica una posible maltooligosil trehalosa sintasa y otros dos genes relacionados con la síntesis de trehalosa, un osmoprotector ampliamente conocido, se indujeron en respuesta a sal y sacarosa: una trehalosa-6-fosfato sintasa (*otsA*) y una posible trehalosa sintasa (SMb20099) que aparece sobreexpresada junto con otros 5 genes con los que probablemente forma un operón (SMb20095, SMb20096, SMb20097, SMb20098 y SMb20100). También se observó una inducción de los genes *thuA*, *thuE* y *thuG* tras un choque osmótico. Estos genes forman parte de un grupo de seis genes implicados en el transporte y utilización de trehalosa (Jensen *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2005).

En *E. coli*, la respuesta a un incremento abrupto en la osmolaridad externa conlleva un aumento rápido de la concentración intracelular de potasio. Para mantener la electroneutralidad, el potasio intracelular debe equilibrarse con aniones. Se sabe que el incremento en la concentración de potasio se acompaña con la acumulación de grandes cantidades de glutamato (McLaggan *et al.*, 1994). En *S. meliloti* se detectó la inducción de genes posiblemente implicados en la biosíntesis de glutamato tras el choque osmótico (SMc01813 y *asnO*) así como represión de algunos genes catabólicos (*nodM*, *glmS* y *gshI*). Por otra parte, tres sistemas distintos de transporte de putrescina (1,4-diaminobutano) se encontraban reprimidos. Se observó la represión de *potD* y *potF* que codifican las proteínas periplásmicas de unión a sustrato de los dos transportadores tipo ABC, uno para el transporte específico de putrescina y otro que transporta preferentemente espermidina, identificados en *E. coli* (revisado por Igarashi y Kashiwagi, 1999). También aparecía reprimido *potB*, que pertenece al mismo operón que *potD*, y dos genes de otro probable operón que también está anotado como parte de un transportador tipo ABC de espermidina y putrescina y que se reprimieron en

respuesta a sacarosa (SMc01965) o a sacarosa y NaCl (SMc01964). La concentración de la poliamina putrescina disminuye en *E. coli* cuando la osmolaridad externa aumenta y es sustituida por potasio (Schiller *et al.*, 2000). Munro y colaboradores (1972) sugieren que la ventaja fisiológica de reemplazar la putrescina (divalente) por potasio (monovalente) es que así se permite un incremento de la osmolaridad citoplásmica con un aumento mínimo de la fuerza iónica intracelular.

La represión de una posible ornitina-DAP o arginina descarboxilasa (SMc02983) podría indicar una inhibición de la biosíntesis de putrescina pero también puede estar relacionada con la inhibición general de genes implicados en la síntesis de aminoácidos durante la adaptación a condiciones hiperosmóticas que ha sido previamente bien documentada (Weber y Jung, 2002; Rüberg *et al.*, 2003). En realidad, se observó represión de muchos genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos (*thrA*, *serC*, *glyA1*, *gcvT*, *gcvP*, *metA*, *metH*, *ilvC*, *proC*, *argG*, *aroQ*, *aroE1*, etc.) pero también inducción de algunos genes catabólicos como *hmgA*, *ald*, *bkdAa* o SMc03211. Los cambios de los niveles de expresión de estos genes probablemente reflejan la reducción de la tasa de crecimiento que se produce en células estresadas. La inhibición general de la síntesis proteica tras el choque osmótico convertiría la biosíntesis de aminoácidos en un gasto superfluo de energía. En consecuencia, la represión de otros procesos relacionados, como la síntesis de ARNt (*hisS*, *proS*, *serS*), no fue una sorpresa.

1.5. Perfiles transcripcionales y agrupamientos génicos

Un objetivo importante de este estudio fue la comparación de la respuesta transcripcional a un incremento de la osmolaridad ocasionado por una elevada salinidad u osmolaridad. Se obtuvieron claras evidencias de que ambos tipos de estrés desencadenaban respuestas altamente solapantes. Sin embargo, la redundancia general en los genes diferencialmente expresados tras la adición de sacarosa o NaCl constituyó una validación de los resultados obtenidos. Por otra parte, el establecimiento del perfil de expresión a lo largo del tiempo durante las primeras fases de la respuesta adaptativa en contraposición con la expresión tras un crecimiento prolongado en condiciones de estrés osmótico, era de gran interés. Estas últimas condiciones fueron las utilizadas por

Rüberg y colaboradores (2003) que usaron Sm6kPCR microarrays, basados en fragmentos de PCR, para determinar la respuesta del transcriptoma de *S. meliloti* en células crecidas en medio GMS hasta una D.O._{600nm} de 0,8 en presencia de 380 mM NaCl.

Un gran número de genes respondían, según los datos obtenidos, a un choque osmótico (1.003) en comparación con los 137 genes que presentaron cambios en su expresión tras un crecimiento prolongado en medio adicionado de NaCl (Rüberg *et al.*, 2003). Esta evidente diferencia podría tener varios orígenes: por una parte, los microarrays utilizados en este trabajo son probablemente más sensibles que los utilizados por Rüberg y colaboradores (2003). Además, estos autores estudiaron sólo un punto temporal tras la exposición a largo plazo de las bacterias a una condición estresante, mientras que en el presente estudio se han determinado las respuestas tempranas (en 4 tiempos distintos) de los cultivos ante 4 condiciones estresantes diferentes (dos concentraciones de cada uno de los dos compuestos utilizados: sacarosa y NaCl). Por último, la respuesta del transcriptoma podría variar a lo largo del tiempo de modo que muchos genes dejaran de estar inducidos o reprimidos.

Para investigar la existencia de posibles patrones en los perfiles de expresión de los genes que respondieron a un estrés osmótico a lo largo del tiempo, se llevó a cabo un análisis de agrupamiento con un total de 615 genes diferencialmente expresados.

Los análisis llevados a cabo definieron dos grandes grupos que separaban de modo general los genes inducidos (329 genes en el grupo A) de los reprimidos (286 genes del grupo B). Entre los 329 genes inducidos se diferenciaron cuatro grupos: los 53 genes del grupo A1, en su mayoría de función desconocida, presentaban una inducción tardía e incluían 48 genes plasmídicos entre los que podemos nombrar a *exoK*, *thuA* y algunos genes *ndi*. El grupo A3 incluía 215 genes que aparecían fuertemente sobreexpresados en la primera hora tras el choque osmótico y sólo moderadamente inducidos 4 horas después. La mayoría de estos genes tenían una localización plasmídica. El grupo A4 estaba constituido por 56 genes, de los que 33 eran cromosómicos, que presentaban una inducción rápida semejante a los genes del grupo A3 pero que a las 4 horas dejaban de encontrarse inducidos e incluso aparecían ligeramente reprimidos. El grupo A2 contenía

sólo 5 genes cuyo perfil de expresión no se correspondía con ninguno de los casos descritos.

La gran mayoría de los 286 genes reprimidos se encontraban en el grupo B3 (264 genes, mayoritariamente de localización cromosómica). Estos genes presentaban un nivel máximo de represión 60 minutos después del choque osmótico y aparecían después moderadamente reprimidos. El grupo B2 incluía 13 genes de represión tardía entre los que se encontraban por ejemplo algunos genes de quimiotaxis (*mcpU*, *mcpZ*). En el grupo B4 aparecían sólo 6 genes con una represión transitoria que se atenuaba a las 4 horas. Por último, el grupo B1 estaba compuesto por 3 genes que no eran propiamente genes reprimidos ya que su expresión pasaba de la represión a la inducción a lo largo del tiempo.

Como vemos, la mayoría de los genes identificados en este estudio presentaron una respuesta transitoria a la adición del compuesto estresante, de tal modo que tras 4 horas de exposición sólo 507 (51%) de los 1.003 genes descritos como de respuesta a estrés osmótico, se mantenían diferencialmente expresados en cualquiera de las cuatro condiciones estudiadas (Fig. R1.5).

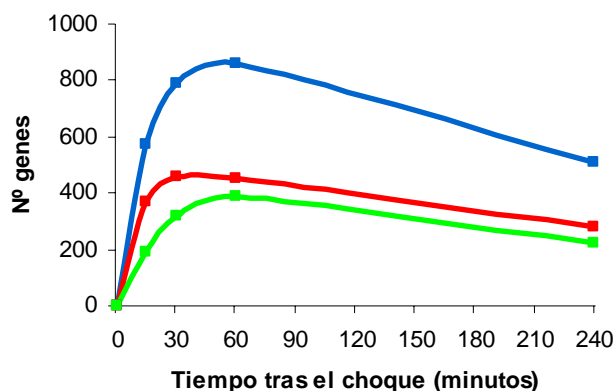


Figura R1.5.- Variación del número de genes considerados como inducidos (rojo) o reprimidos (verde) en cualquiera de las condiciones estudiadas a lo largo del tiempo. En azul se representa el número total de genes diferencialmente expresados a lo largo del tiempo.

Es razonable pensar que el número de genes diferencialmente expresados pudiera haber seguido reduciéndose a lo largo del tiempo puesto que también la intensidad de los cambios transcripcionales disminuye con el tiempo (Fig. R1.2). En consonancia con este hecho, se observó una respuesta transcripcional más intensa de muchos de los grupos funcionales identificados tras una exposición prolongada a condiciones de

salinidad (motilidad y quimiotaxis, biosíntesis de aminoácidos, captación de hierro; Rüberg *et al.*, 2003) junto con nuevos grupos (metabolismo energético, síntesis proteica, división celular) no descritos anteriormente y que probablemente se relacionan con una respuesta inmediata y transitoria ante los cambios en la osmolaridad del medio.

Resultados: Capítulo 2

2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE SISTEMAS DE TRANSPORTE DE POTASIO EN *Sinorhizobium meliloti* Y *Mesorhizobium loti*

El potasio es el catión más abundante en todas las células, procariotas y eucariotas. De hecho, todos los organismos poseen diversos sistemas de transporte de potasio, lo que les permite regular distintas funciones celulares bajo un amplio rango de condiciones ambientales. *Escherichia coli* posee tres sistemas de transporte de potasio al interior celular: Kdp, Trk y Kup. El sistema Trk es necesario para la acumulación de potasio en medios hiperosmóticos y otras condiciones, mientras que Kdp está implicado en la captación de potasio en medios con bajo contenido en este catión (Sleator y Hill, 2001). Por último, Kup es de gran importancia para la adaptación a medios hiperosmóticos a bajo pH (Zakharyan y Trchounian, 2001).

La acumulación de potasio intracelular es una de las respuestas más comunes de los rizobios en su adaptación a estrés osmótico (Zahran, 1999) y se sabe que el sistema Kup de *Rhizobium tropici* es necesario para el crecimiento en medios con alta osmolaridad y tiene además una gran importancia para la fijación de nitrógeno en nódulos de *Phaseolus vulgaris* (Nogales *et al.*, 2002).

Para un estudio más completo de la importancia de los sistemas de transporte de potasio de *Rhizobium* en su adaptación a estrés hiperosmótico y en el establecimiento de simbiosis fijadoras de nitrógeno, se han elegido dos simbiosis, la establecida entre *S. meliloti* y *Medicago sativa*, en la que se forman nódulos de tipo indeterminado, y la formada por *M. loti* y *Lotus tenuis*, con nódulos de tipo determinado. Ambos tipos de nódulos muestran diferencias tanto en su génesis como en su anatomía final, y en el tipo de metabolismo nitrogenado, fundamentalmente en la forma en que el nitrógeno fijado por el bacteroide es exportado. El estudio paralelo de estas dos simbiosis modelo permitirá generalizar los resultados, o bien definir las diferencias que puedan encontrarse entre ambas simbiosis.

2.1 Caracterización de genes implicados en el transporte de potasio en *S. meliloti* y *M. loti*

En el genoma de *S. meliloti* 1021 aparecen anotados genes homólogos a los que en *E. coli* codifican cada uno de los tres sistemas conocidos de influjo de potasio (Galibert *et al.*, 2001). Entre los componentes del sistema Trk podemos encontrar los genes *trkA* (SMc01046) y *trkH* (SMc00937), ambos localizados en el cromosoma aunque alejados uno de otro, y un gen descrito como “*trkH-like*” (SMA1691) que presenta un 79% de identidad con SMc00937 y que se encuentra localizado en el plásmido pSymA. El gen anotado como *trkA* (SMc01046) codifica una proteína de 458 aminoácidos que presenta un 39% y un 40% de identidad con las proteínas TrkA de *Salmonella enterica* y *E. coli* respectivamente. La proteína codificada por el gen anotado como *trkH* (SMc00937) tiene un 35% de identidad con las subunidades TrkH de *S. typhimurium* y *E. coli* y un 32% de identidad con la subunidad TrkG de *E. coli*. Por último, el gen SMA1691, anotado como “*trkH-like*”, codifica una proteína de 484 aminoácidos que presenta un 34% de identidad con la subunidad TrkH de *S. typhimurium* y un 33% y 32% de identidad respectivamente con las subunidades TrkH y TrkG de *E. coli*.

La presencia de genes homólogos al sistema Trk es poco frecuente entre los rizobios y sólo se han encontrado en *S. medicae* WSM419 y en *Mesorhizobium* sp. BCN1, además de en *S. meliloti*. La situación en *S. medicae* es muy parecida a la de *S. meliloti*. Encontramos un gen *trkA* con un 97% de identidad con su homólogo en *S. meliloti* y dos genes con homología a *trkH* que se encuentran anotados como transportadores de cationes: el gen Smed_1374, que tiene un 92% de identidad con SMc00937 y un 78% con SMA1691, y el gen Smed_5285, que presenta un 94% de identidad con SMA1691 y un 77% con SMc00937. En *Mesorhizobium* sp. BCN1 aparece un gen *trkA* con un 67% de identidad con el *trkA* de *S. meliloti* y un gen anotado como un transportador de cationes (Meso_1567) que presenta un 60% y un 55% de identidad respectivamente con los genes SMc00937 y SMA1691 de *S. meliloti*.

La situación es muy diferente en el caso del sistema Kdp, ya que se encuentra presente entre los rizobios de manera generalizada. Los genes *kdpABC* aparecen anotados en los genomas de *S. meliloti* 1021, *S. medicae* WSM419, *M. loti*

MAFF303099, *Rhizobium etli* CFN42, *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841, *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, *Bradyrhizobium* sp. ORS278 y *Bradyrhizobium* sp. BTAi1. En todos los casos estos genes aparecen formando un operón con al menos otros dos genes cuyos productos presentan homología con el sistema regulador de dos componentes KdpDE, aunque no siempre aparecen anotados como tales. Los genes *kdp* se encuentran altamente conservados entre los rizobios y presentan homólogas muy elevadas con otros sistemas Kdp conocidos. Por ejemplo, los genes *kdpA* tanto de *S. meliloti* 1021 (SMa2333) como de *M. loti* MAFF303099 (mll3133) tienen más de un 50% de identidad con los *kdpA* de *E. coli* o *S. typhimurium* y en el caso de los genes *kdpB* la homología es superior al 60% de identidad con los correspondientes genes de *E. coli* y *S. typhimurium*. En la tabla R2.1 se presenta como ejemplo la homología del gen *kdpA* de *S. meliloti* con los genes *kdpA* de distintos rizobios y se puede observar que el mínimo es de un 60% de identidad.

Tabla R2.1.- Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *kdpA* (SMa2333) de *S. meliloti* 1021 y las de otros rizobios.

Organismo	Gen	Identidad
<i>S. medicae</i> WSM419	Smed_5358	85%
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_PE00266	62%
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	pRL110381	61%
<i>M. loti</i> MAFF303099	mll3133	62%
<i>B. japonicum</i> USDA110	bll6779	60%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	BRADO5830	60%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_6338	60%

La presencia de varios sistemas Kup parece un rasgo común entre los rizobios. En *S. meliloti* 1021 y *M. loti* MAFF303099 parecen existir dos copias del gen *kup*. En *M. loti* MAFF303099 los genes *kup* (mll1416 y mll1417) se encuentran en el cromosoma formando un operón (Kaneko *et al.*, 2000), mientras que en *S. meliloti* 1021 encontramos el gen *kup1* (SMc00873) localizado en el cromosoma y el *kup2* (SMa1798) localizado en el plásmido pSymA.

El gen *kup1* (SMc00873) de *S. meliloti* codifica una proteína de 622 aminoácidos con un 42% de identidad con el gen *kup* de *E. coli* y con una elevada homología con genes de sistemas de transporte de potasio tipo Kup en otros rizobios (Tabla R2.2).

Tabla R2.2.- Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *kup1* (SMc00873) de *S. meliloti* 1021 y las de otros rizobios.

Organismo	Gen	Identidad
<i>S. medicae</i> WSM419	Smed_0444	95%
<i>S. medicae</i> WSM419	Smed_6041	72%
<i>S. medicae</i> WSM419	Smed_6370	69%
<i>S. meliloti</i> 1021	SMA1798	70%
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_CH00861	76%
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_PA00104	74%
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_CH02603	65%
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	RL0922	76%
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	RL3014	64%
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	pRL110337	53%
<i>B. japonicum</i> USDA110	blr3802	56%
<i>B. japonicum</i> USDA110	blr3803	54%
<i>B. japonicum</i> USDA110	blr4695	41%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	BRADO4685	55%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	BRADO4684	54%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	BRADO1466	44%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_3512	55%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_3513	55%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_3454	44%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_7401	39%
<i>M. loti</i> MAFF303099	mll1417	54%
<i>M. loti</i> MAFF303099	mll1416	53%

Como podemos observar, la mayoría de los rizobios tienen tres o incluso cuatro sistemas de transporte tipo Kup. En la tabla R2.3 se presentan las homologías del gen *kup2* (SMa1798) de *S. meliloti* con estos sistemas. Este gen codifica una proteína de 633 aminoácidos que presenta un 41% de identidad con el sistema Kup de *E. coli*.

Tabla R2.3.- Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *kup2* (SMa1798) de *S. meliloti* 1021 y las de otros rizobios.

Organismo	Gen	Identidad
<i>S. medicae</i> WSM419	Smed_6370	97%
<i>S. medicae</i> WSM419	Smed_6041	87%
<i>S. medicae</i> WSM419	Smed_0444	70%
<i>S. meliloti</i> 1021	SMc00873	70%
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_CH00861	67%
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_PA00104	66%
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_CH02603	66%
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	RL0922	67%
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	RL3014	66%
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	pRL110337	51%
<i>B. japonicum</i> USDA110	blr3802	54%
<i>B. japonicum</i> USDA110	blr3803	52%
<i>B. japonicum</i> USDA110	blr4695	40%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	BRADO4685	54%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	BRADO4684	53%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	BRADO1466	45%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_3513	54%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_3512	53%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_3454	43%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_7401	40%
<i>M. loti</i> MAFF303099	mll1417	52%
<i>M. loti</i> MAFF303099	mll1416	50%

El gen mll1417 (*kup1*) de *M. loti* codifica una proteína de 637 aminoácidos con elevada homología a sistemas Kup de otras bacterias. En la tabla R2.4 se presentan los porcentajes de identidad de esta proteína con otros sistemas Kup presentes entre los rizobios.

Tabla R2.4.- Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *kup1* (mll1417) de *M. loti* MAFF303099 y las de otros rizobios.

Organismo	Gen	Identidad
<i>M. loti</i> MAFF303099	mll1416	79%
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	pRL110337	63%
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	RL0922	53%
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	RL3014	53%
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_CH00861	54%
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_PA00104	54%
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_CH02603	52%
<i>B. japonicum</i> USDA110	blr3802	60%
<i>B. japonicum</i> USDA110	blr3803	58%
<i>B. japonicum</i> USDA110	blr4695	43%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	BRADO4685	59%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	BRADO4684	59%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	BRADO1466	46%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_3512	59%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_3513	58%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_3454	48%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_7401	43%
<i>S. medicae</i> WSM419	Smed_0444	54%
<i>S. medicae</i> WSM419	Smed_6041	54%
<i>S. medicae</i> WSM419	Smed_6370	52%
<i>S. meliloti</i> 1021	SMc00873	54%
<i>S. meliloti</i> 1021	SMa1798	52%

Por último, el gen mll1416 (*kup2*) de *M. loti* codifica una proteína de 639 aminoácidos que también presenta elevada homología con otros sistemas Kup presentes entre los rizobios (Tabla R2.5).

Tabla R2.5.- Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *kup2* (mll1416) de *M. loti* MAFF303099 y las de otros rizobios.

Organismo	Gen	Identidad
<i>M. loti</i> MAFF303099	mll1417	79%
<i>R. leguminosarum</i> bv. viciae	pRL110337	60%
<i>R. leguminosarum</i> bv. viciae	RL0922	52%
<i>R. leguminosarum</i> bv. viciae	RL3014	51%
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_CH00861	52%
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_PA00104	51%
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_CH02603	51%
<i>B. japonicum</i> USDA110	blr3803	59%
<i>B. japonicum</i> USDA110	blr3802	57%
<i>B. japonicum</i> USDA110	blr4695	43%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	BRADO4685	58%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	BRADO4684	58%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	BRADO1466	44%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_3513	58%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_3512	57%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_3454	46%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_7401	41%
<i>S. medicae</i> WSM419	Smed_0444	53%
<i>S. medicae</i> WSM419	Smed_6041	52%
<i>S. medicae</i> WSM419	Smed_6370	50%
<i>S. meliloti</i> 1021	SMc00873	53%
<i>S. meliloti</i> 1021	SMa1798	50%

Con estos antecedentes, se planteó como uno de los objetivos de este trabajo determinar la importancia de cada uno de estos supuestos sistemas de transporte de potasio para la osmoadaptación de *S. meliloti* y *M. loti*. Para ello, se utilizaron cepas de *S. meliloti* 1021 y *M. loti* MAFF303099 carentes de cada uno de los sistemas de transporte de potasio descritos, así como de mutantes en los que se inactiven simultáneamente varios de dichos sistemas.

Inicialmente, se construyeron mutantes simples de *S. meliloti* 1021 en cada uno de los 4 sistemas de transporte de potasio descritos: 10K1K (Kup1⁻), 10K2SS (Kup2⁻), 10KdpSS (Kdp⁻) y 10tAG (Trk⁻) y un doble mutante en el que se encontraban interrumpidas ambas copias del gen *kup* (*kup1* y *kup2*) para asegurar la inactivación del sistema Kup: 10K1K2 (Kup1⁻, Kup2⁻). Posteriormente y como consecuencia de los resultados obtenidos, se construyeron además mutantes dobles en los que se encontraba inactivado el sistema Trk y cada uno de los otros tres sistemas descritos: 10tAK1 (Trk⁻, Kup1⁻), 10tAK2 (Trk⁻, Kup2⁻) y 10tAKdp (Trk⁻, Kdp⁻) y mutantes triples en los que se encontraban inactivados los sistemas Trk, Kup1 y cada uno de los otros dos sistemas descritos: 10tAK21 (Trk⁻, Kup1⁻, Kup2⁻) y 10tAKK (Trk⁻, Kup1⁻, Kdp⁻). La obtención de los distintos mutantes de *S. meliloti* 1021 se describe en el anexo 2.1.

En *M. loti* MAFF303099 se construyó un mutante en el operón *kdp* que se denominó MKdpT. Sin embargo, resultó imposible la obtención de un mutante en el que se encontrara inactivado el operón *kup* completo aunque sí pudo obtenerse un mutante simple en el gen *kup2* (MKup2). Puesto que Kdp se conoce como un sistema que se encuentra activo sólo a bajas concentraciones de potasio en el medio, es posible que la mutación simultánea de ambos genes *kup* resulte letal para la bacteria por imposibilitar la captación de potasio en las condiciones de crecimiento normales. De hecho, ya el mutante en el gen *kup2* presentó ligeros problemas de crecimiento en las condiciones de cultivo habituales. La obtención de los distintos mutantes de *M. loti* MAFF303099 se describe en el anexo 2.2.

2.2 Optimización de las condiciones de estrés a utilizar

Para establecer las condiciones más adecuadas en las que estudiar la capacidad de osmoadaptación de los mutantes obtenidos se llevaron a cabo curvas de crecimiento con las dos cepas parentales *S. meliloti* 1021 y *M. loti* MAFF303099 en medio líquido a distintas concentraciones de NaCl y sacarosa. Se inoculó cada tubo con 10^6 - 10^7 ufc de la cepa a estudiar y se estableció el crecimiento como una función de la DO_{600nm} medida a lo largo de 120 horas (Fig. R2.1, R2.2, R2.3 y R2.4).

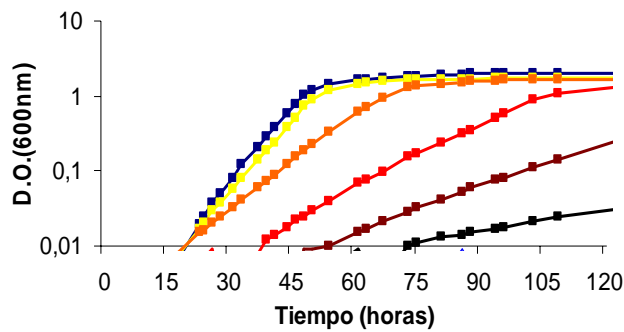


Figura R2.1.- Curvas de crecimiento de *S. meliloti* 1021 en medio mínimo adicionado de NaCl a distintas concentraciones:

■ 0 mM; ■ 200 mM; ■ 300 mM;
■ 400 mM; ■ 500mM; ■ 600mM.

En la figura R2.1 se presentan las curvas de crecimiento de *S. meliloti* 1021 a 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM y 600 mM NaCl. Esta cepa fue incapaz de crecer a 700 mM NaCl y se encontró muy afectada a 600 mM como se puede observar en la imagen. Por otra parte, la concentración más baja empleada (200 mM) apenas si tuvo un efecto sobre su capacidad de crecimiento. En consecuencia se decidió utilizar 300 mM, 400 mM y 500 mM NaCl como concentraciones óptimas para posteriores estudios con cepas derivadas de *S. meliloti* 1021.

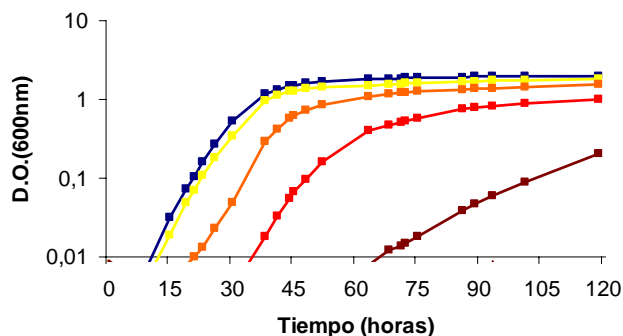
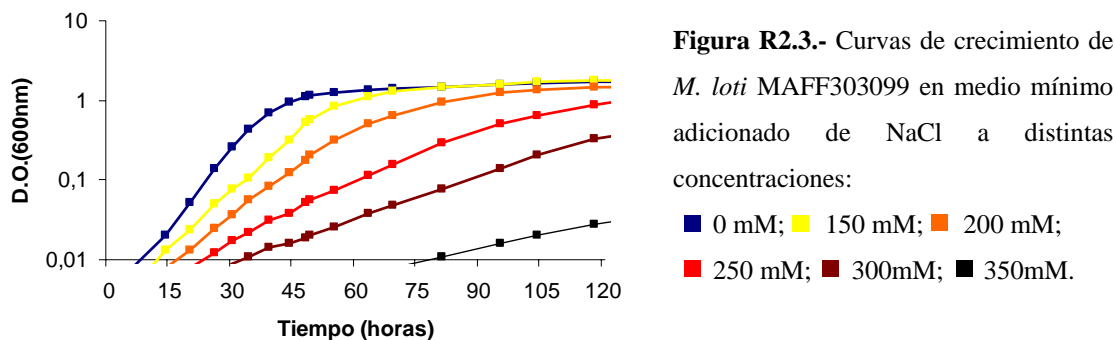


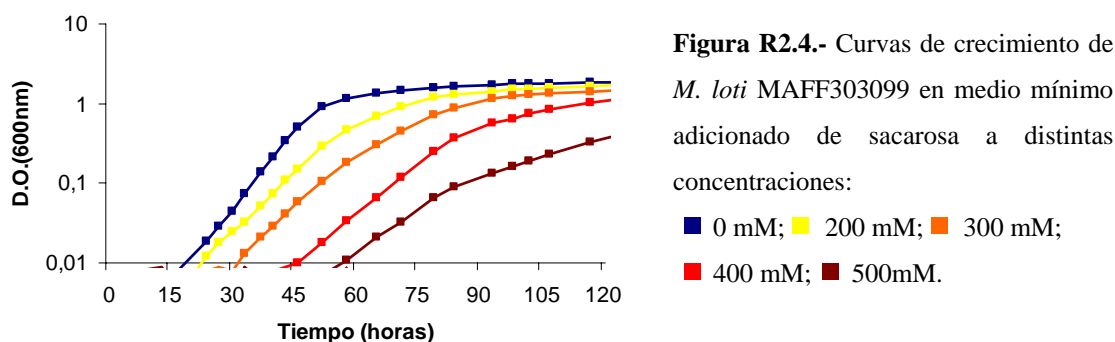
Figura R2.2.- Curvas de crecimiento de *S. meliloti* 1021 en medio mínimo adicionado de sacarosa a distintas concentraciones:

■ 0 mM; ■ 300 mM; ■ 500 mM;
■ 700 mM; ■ 900mM.

El crecimiento de *S. meliloti* 1021 a 300 mM, 500 mM, 700 mM y 900 mM sacarosa se presenta en la figura R2.2. Esta cepa no llegó a crecer a 1100 mM sacarosa, se encontró muy afectada a 900 mM y en cambio apenas presentó cambios en su crecimiento a 300 mM. Con estos datos se decidió utilizar 500 mM y 700 mM para los estudios en mutantes de *S. meliloti* 1021.



M. loti MAFF303099 mostró una mayor sensibilidad a los compuestos estresantes utilizados que *S. meliloti*. *M. loti* fue incapaz de crecer a 400 mM NaCl, su capacidad de crecimiento a 350 mM se encontraba muy disminuida y su capacidad de crecimiento a 300 mM resultó ser inconsistente y variar mucho según el experimento por lo que consideramos más apropiado utilizar 150 mM, 200 mM y 250 mM NaCl como concentraciones de estudio para los mutantes de *M. loti* MAFF303099.



En la figura R2.4 se presentan las curvas de crecimiento de *M. loti* MAFF303099 a 200 mM, 300 mM, 400 mM y 500 mM sacarosa. Esta cepa fue incapaz de crecer a 700 mM sacarosa y se encontró muy poco afectada por la adición de 200 mM de este

compuesto, por lo que se seleccionaron 300 mM, 400 mM y 500 mM sacarosa como concentraciones apropiadas para los estudios subsiguientes.

2.3 Capacidad de osmoadaptación en vida libre de mutantes en sistemas de transporte de potasio de *S. meliloti*

2.3.1. Crecimiento de los mutantes de *S. meliloti* 1021 en medio líquido

Los mutantes 10tAK1 (Trk^- , Kup1^-), 10tAK21 (Trk^- , Kup1^- , Kup2^-) y 10tAKK (Trk^- , Kup1^- , Kdp^-) presentaron graves problemas de crecimiento tanto en medio mínimo como en medio TY (Fig. R2.5). Las dificultades observadas fueron incluso más acusadas en medio líquido (datos no mostrados), por lo que no se utilizaron en los estudios de crecimiento que se presentan. Además, los mutantes triples presentaron una tendencia a formar revertientes que fueron claramente detectables en medio sólido, pudiendo apreciarse la aparición de colonias que mantenían la resistencia a los distintos antibióticos pero eran capaces de crecer a un ritmo muy superior al del mutante del que procedían. Es probable que estos revertientes deban su fenotipo a una pérdida de la regulación del sistema de transporte aún presente en su genotipo que les permita la captación de potasio en las condiciones ensayadas.

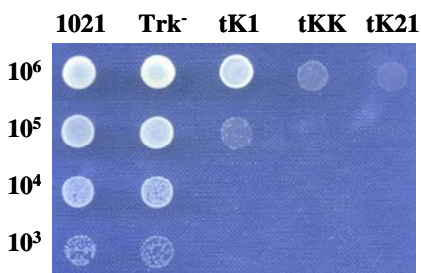


Figura R2.5.- Crecimiento en TY de mutantes en sistemas de transporte de potasio de *S. meliloti* 1021. Cada gota contiene aproximadamente el número de ufc indicado a la izquierda. Cada columna corresponde a la cepa que se señala en la parte superior de la imagen.

tK1: Trk^- , Kup1^- ; **tKK:** Trk^- , Kup1^- , Kdp^- ; **tK21:** Trk^- , Kup1^- , Kup2^-

Los demás mutantes presentaron un crecimiento en medio mínimo comparable al de la cepa parental (Fig. R2.6). Con ellos se realizaron curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 300 mM, 400 mM y 500 mM NaCl (Fig. R2.7, R2.8 y R2.9) y de 500 mM y 700 mM sacarosa (Fig. R2.10 y R2.11). Para ello se inoculó cada tubo con 10^6 - 10^7 ufc de la cepa de interés y se estableció el crecimiento como una función de la

DO_{600nm} medida a lo largo de 100-150 horas. Se incluyó la cepa parental *S. meliloti* 1021 como referencia.

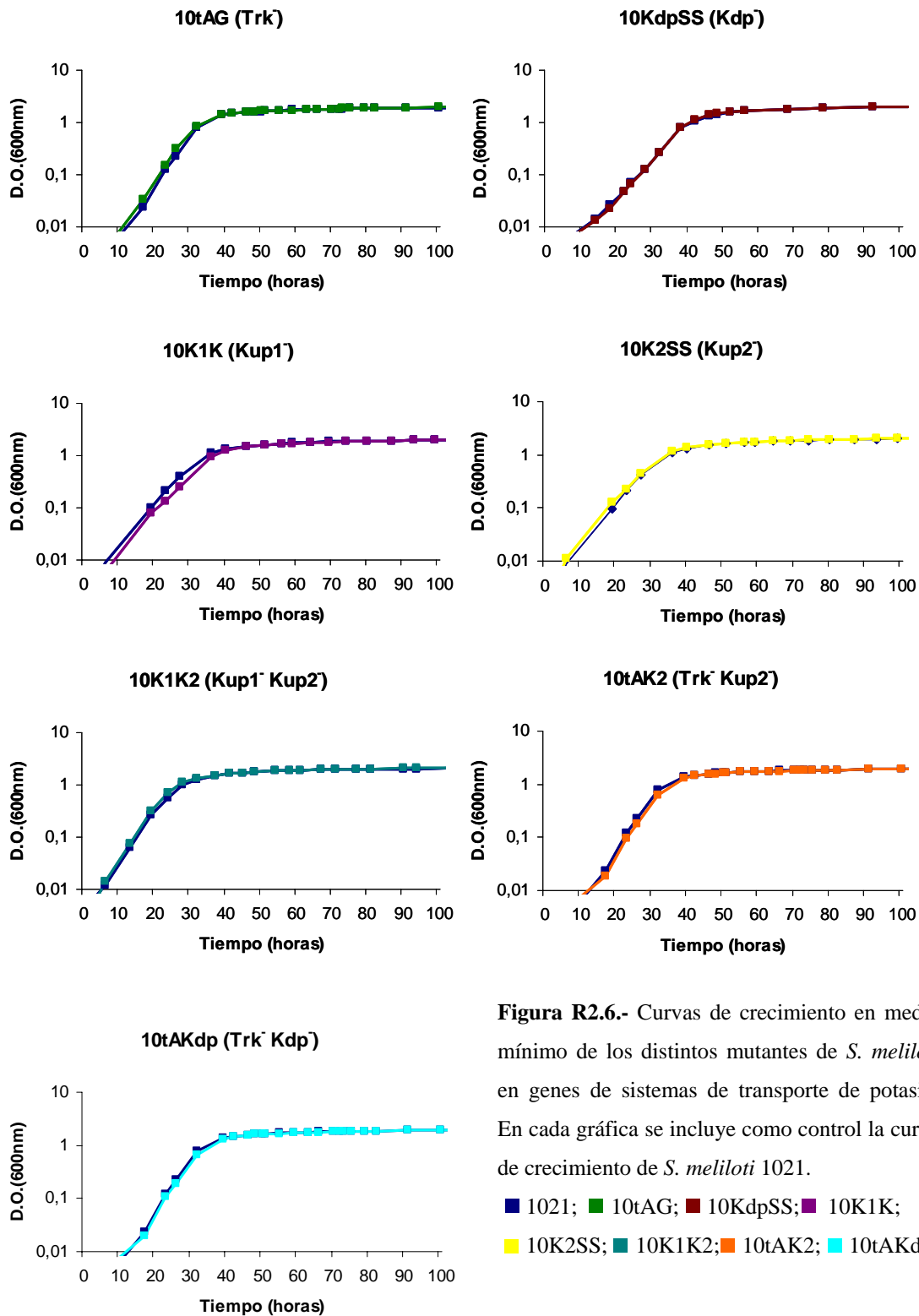


Figura R2.6.- Curvas de crecimiento en medio mínimo de los distintos mutantes de *S. meliloti* en genes de sistemas de transporte de potasio. En cada gráfica se incluye como control la curva de crecimiento de *S. meliloti* 1021.

■ 1021; ■ 10tAG; ■ 10KdpSS; ■ 10K1K;
 ■ 10K2SS; ■ 10K1K2; ■ 10tAK2; ■ 10tAKdp.

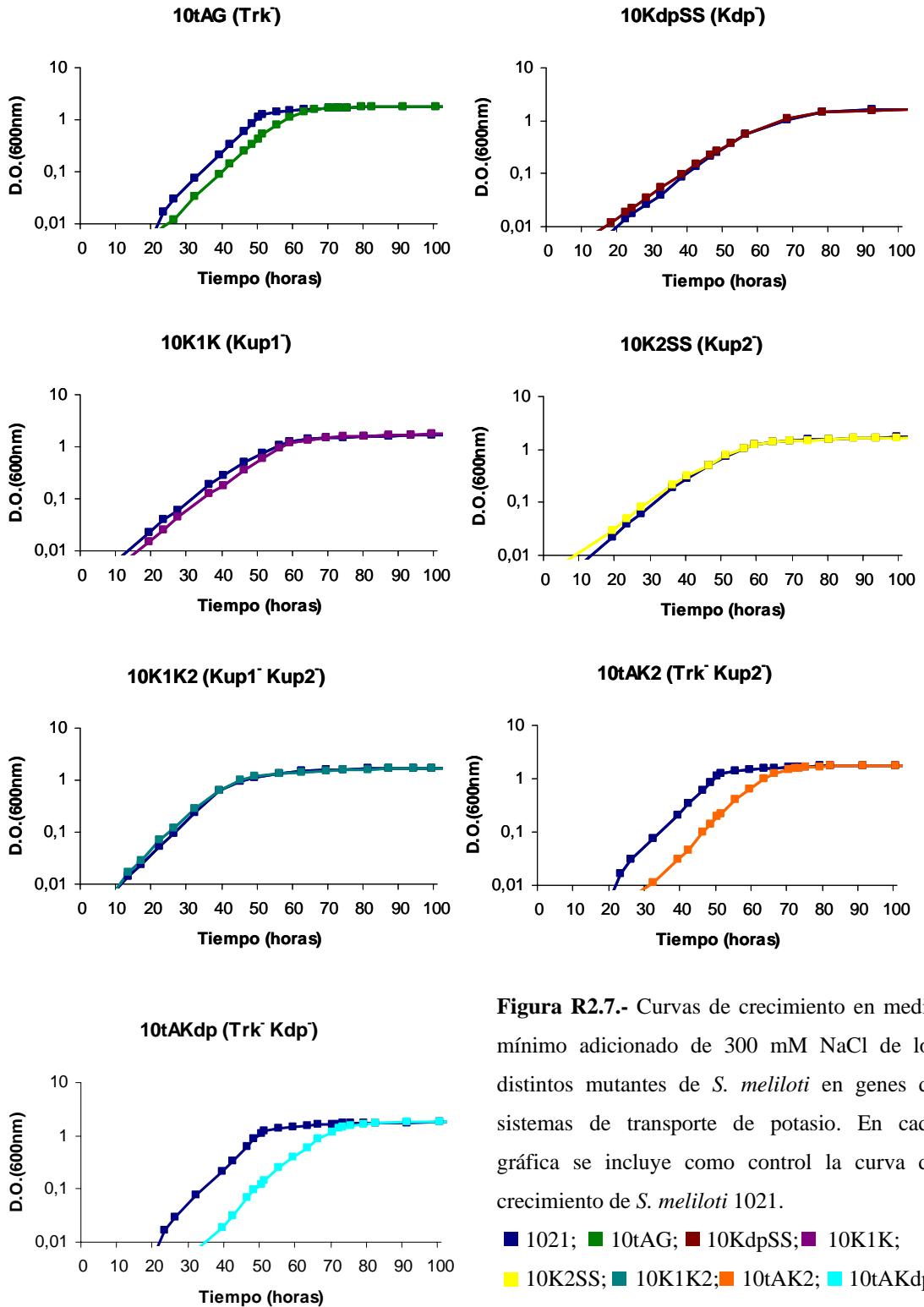


Figura R2.7.- Curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 300 mM NaCl de los distintos mutantes de *S. meliloti* en genes de sistemas de transporte de potasio. En cada gráfica se incluye como control la curva de crecimiento de *S. meliloti* 1021.

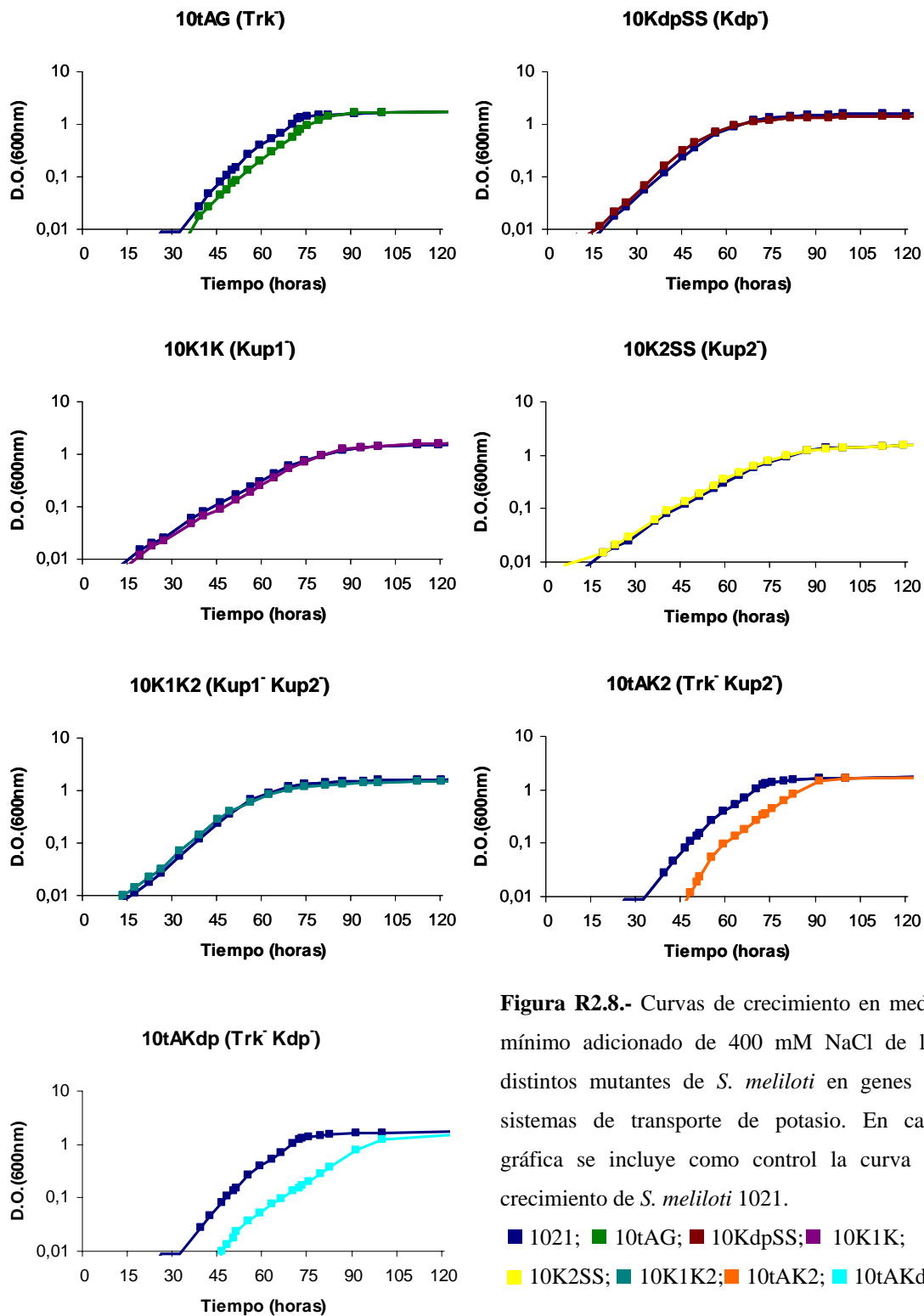


Figura R2.8.- Curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 400 mM NaCl de los distintos mutantes de *S. meliloti* en genes de sistemas de transporte de potasio. En cada gráfica se incluye como control la curva de crecimiento de *S. meliloti* 1021.

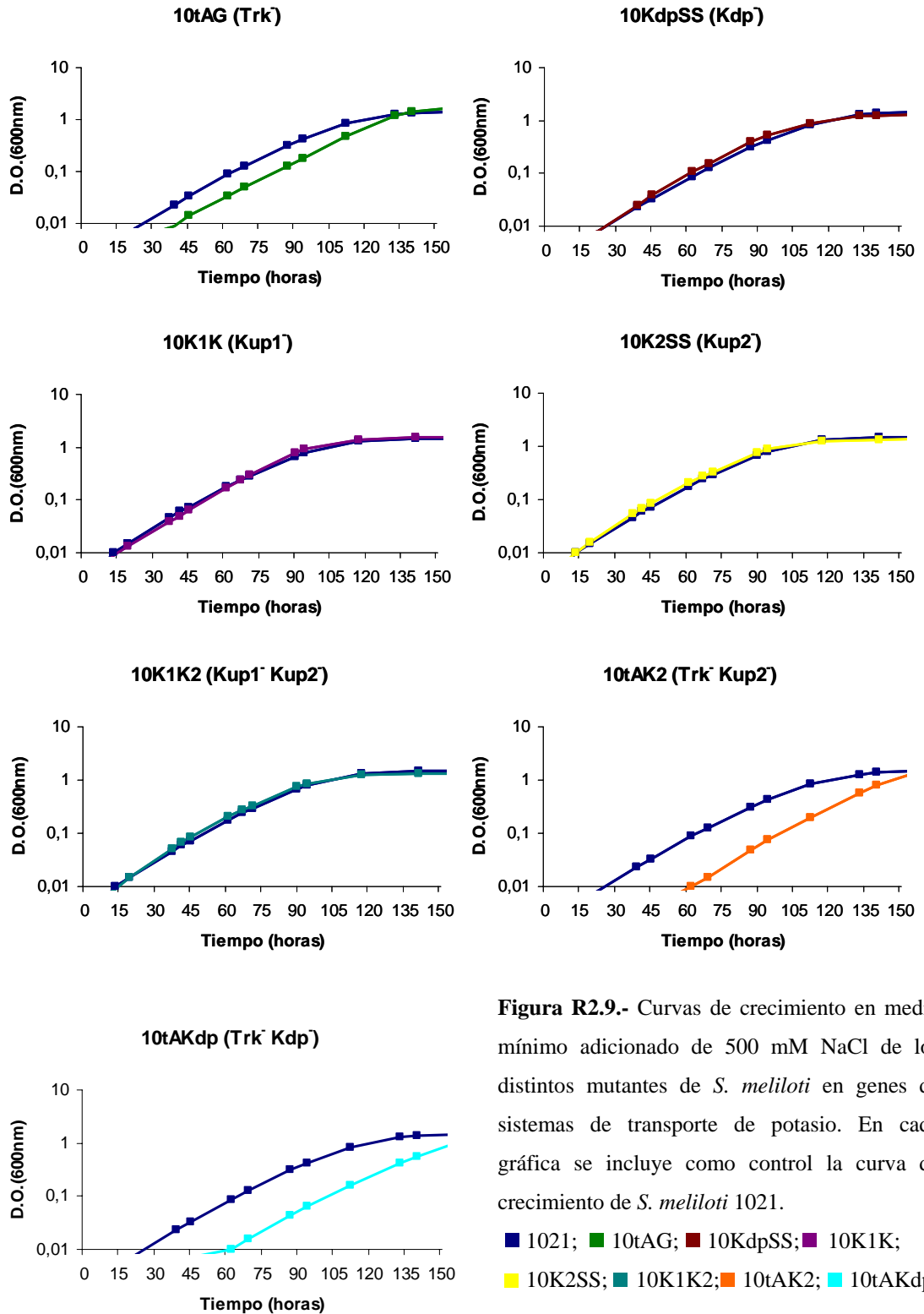


Figura R2.9.- Curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 500 mM NaCl de los distintos mutantes de *S. meliloti* en genes de sistemas de transporte de potasio. En cada gráfica se incluye como control la curva de crecimiento de *S. meliloti* 1021.

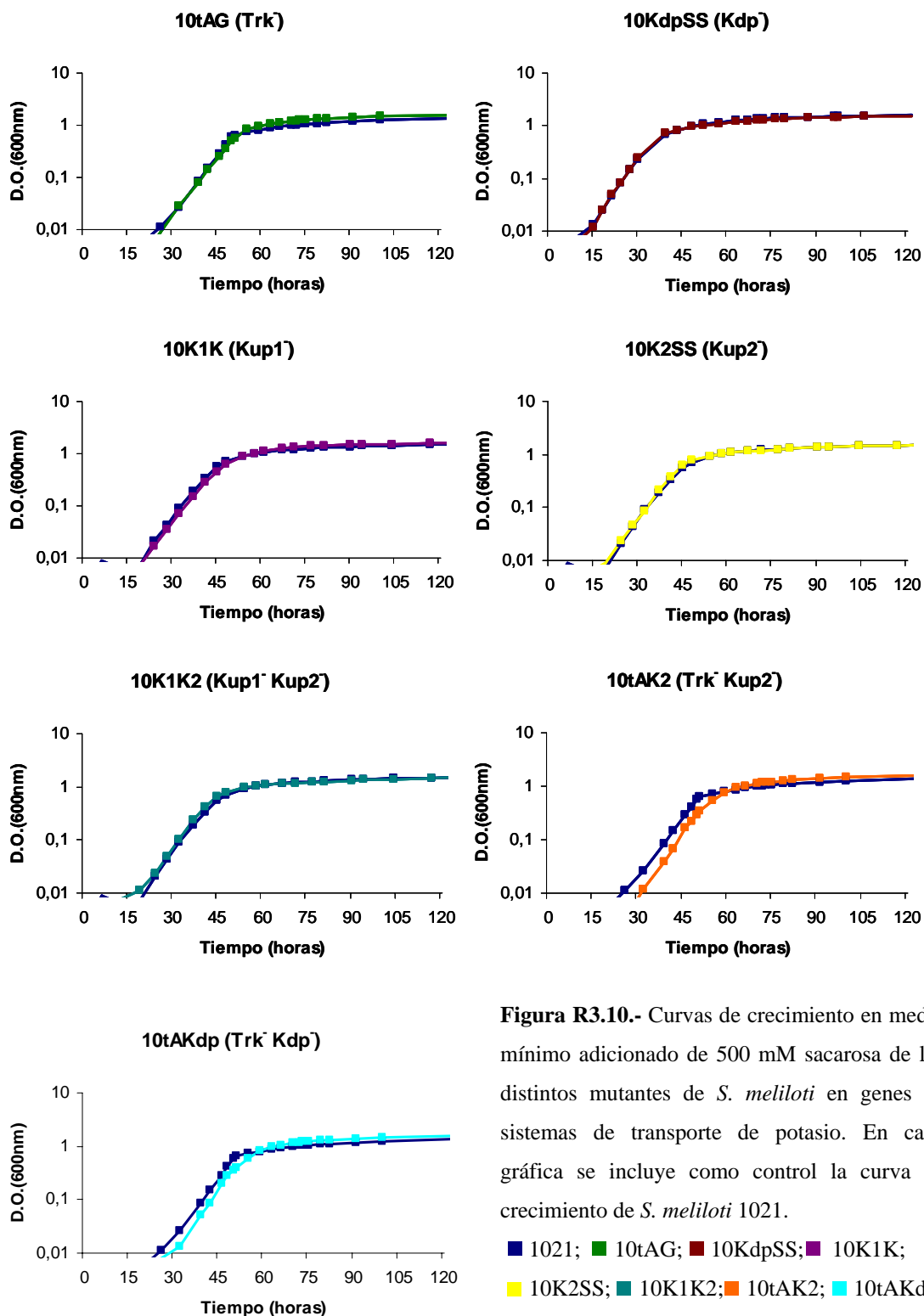


Figura R3.10.- Curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 500 mM sacarosa de los distintos mutantes de *S. meliloti* en genes de sistemas de transporte de potasio. En cada gráfica se incluye como control la curva de crecimiento de *S. meliloti* 1021.

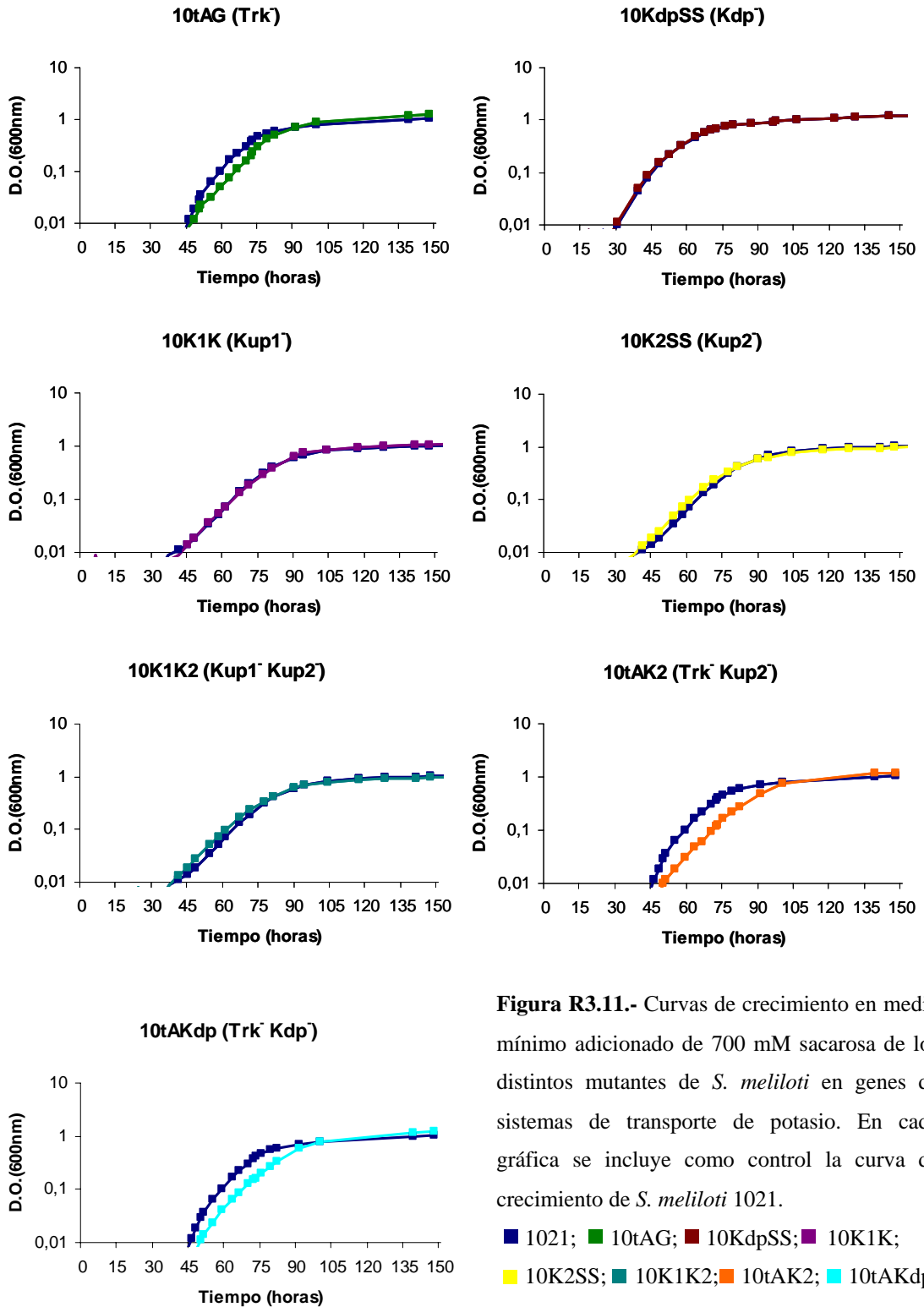


Figura R3.11.- Curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 700 mM sacarosa de los distintos mutantes de *S. meliloti* en genes de sistemas de transporte de potasio. En cada gráfica se incluye como control la curva de crecimiento de *S. meliloti* 1021.

Podemos apreciar que entre los mutantes con una capacidad de crecimiento en medio mínimo semejante a la de la cepa parental, sólo aquellos que carecían del sistema Trk mostraron un crecimiento disminuido en alguna de las condiciones de estrés ensayadas (Fig. R2.7, R2.8, R2.9, R2.10 y R2.11).

El mutante simple Trk^- (10tAG) mostró un crecimiento menor que el de la cepa parental en cualquiera de las tres concentraciones de NaCl ensayadas (Fig. R2.7, R2.8 y R2.9) y en 700 mM sacarosa (Fig. R2.11). Aunque la diferencia fue leve en todos los casos, el fenotipo se repitió de modo consistente. Además, los mutantes dobles 10tAK2 (Trk^- , Kup2^-) y 10tAKdp (Trk^- , Kdp^-) también presentaron dificultades para crecer en esas mismas condiciones, aunque las diferencias fueron mucho más acusadas y pudo apreciarse un ligero retraso respecto a la cepa parental *S. meliloti* 1021 en el crecimiento de estos mutantes en 500 mM sacarosa (Fig. R2.10), que no había tenido efecto sobre el crecimiento del mutante simple 10tAG (Trk^-). En todos los casos, los retrasos en el crecimiento de las cepas afectadas fueron mayores en presencia de NaCl que de sacarosa, aunque las distintas concentraciones de un mismo compuesto provocaron variaciones muy leves de la respuesta.

Estos datos indican que el sistema principalmente implicado en la respuesta a estrés osmótico de *S. meliloti* 1021 es Trk, ya que su ausencia provoca deficiencias en la capacidad de osmoadaptación de la cepa mutante. Los sistemas Kup2 y Kdp también se encuentran implicados, aunque en menor medida, en la captación de potasio en respuesta a estrés osmótico ya que su mutación tiene un efecto aditivo sobre la mutación del sistema Trk en la tolerancia a NaCl o sacarosa de las cepas 10tAK2 (Trk^- , Kup2^-) y 10tAKdp (Trk^- , Kdp^-).

Puesto que la carencia simultánea de los sistemas Trk y Kup1 conduce a una deficiencia en el crecimiento del doble mutante 10tAK1, incluso en condiciones no estresantes, cabe señalar que la presencia de al menos uno de estos dos sistemas es esencial para la homeostasis del potasio en *S. meliloti* 1021.

2.3.2. Crecimiento de los mutantes de *S. meliloti* 1021 en medio sólido

La capacidad de osmoadaptación de los mutantes obtenidos se determinó también sobre placas de medio mínimo tamponado con una combinación de Tris y MES (5 mM) a pH 6, pH 6,5 o pH 7. Para cada uno de estos tres pH se prepararon placas con NaCl (300 mM, 400 mM y 500 mM) o sacarosa (500 mM, 600 mM y 700 mM). Además, se estudió el comportamiento de estos mutantes en medio con bajo contenido en potasio, que se preparó tamponado a pH 7, en combinación con los estreses indicados. En cada placa se compararon varios mutantes con la cepa parental colocando gotas de 10 µl de diluciones seriadas (desde unas 10² hasta 10⁵ ufc), de tal modo que cada columna representaba una de las cepas ensayadas y cada fila, una dilución. En todas las placas se incluyó la cepa parental *S. meliloti* 1021 como referencia y se utilizó como control el correspondiente medio sin NaCl o sacarosa añadidos (Fig. R2.12).

A pH 6 la cepa parental fue incapaz de crecer a las concentraciones más altas de solutos empleadas (500 mM NaCl y 700 mM sacarosa) por lo que estos resultados no se presentan. En el resto de los casos se pueden observar por una parte placas en las que se compara el crecimiento de los cuatro mutantes simples y del doble mutante 10K1K2 (Kup1⁻, Kup2⁻) con el de la cepa parental *S. meliloti* 1021, y por otra parte placas en las que se compara el crecimiento de los dobles mutantes obtenidos a partir de 10tAG, carente del sistema Trk, con el del mutante simple y el de la cepa parental.

El doble mutante 10tAK1 (Trk⁻, Kup1⁻) se incluyó en estos estudios, a pesar de que como ya se dijo en el apartado anterior, y como puede apreciarse en la figura R2.12, tuvo un crecimiento claramente deficiente ya en los medios no estresantes por lo que resulta difícil extraer conclusiones sobre su comportamiento bajo estrés osmótico.

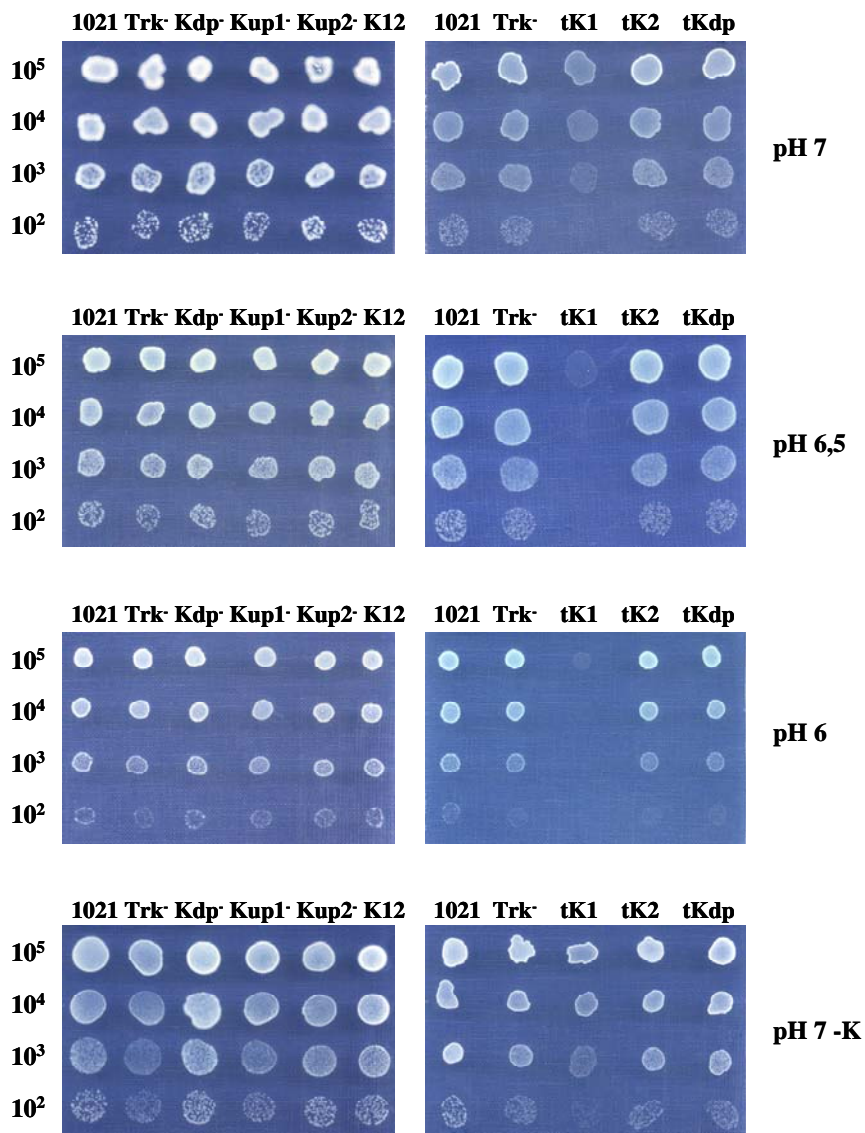


Figura R2.12.- Crecimiento en medio mínimo sólido al pH que se indica a la derecha, de los mutantes de *S. meliloti* en genes de sistemas de transporte de potasio. En cada fila, las gotas contienen aproximadamente el número de ufc indicado a la izquierda. Cada columna corresponde a la cepa que se señala en la parte superior de la imagen.

K12: Kup1⁻, Kup2⁻; **tK1:** Trk⁻, Kup1⁻; **tK2:** Trk⁻, Kup2⁻; **tKdp:** Trk⁻, Kdp⁻.

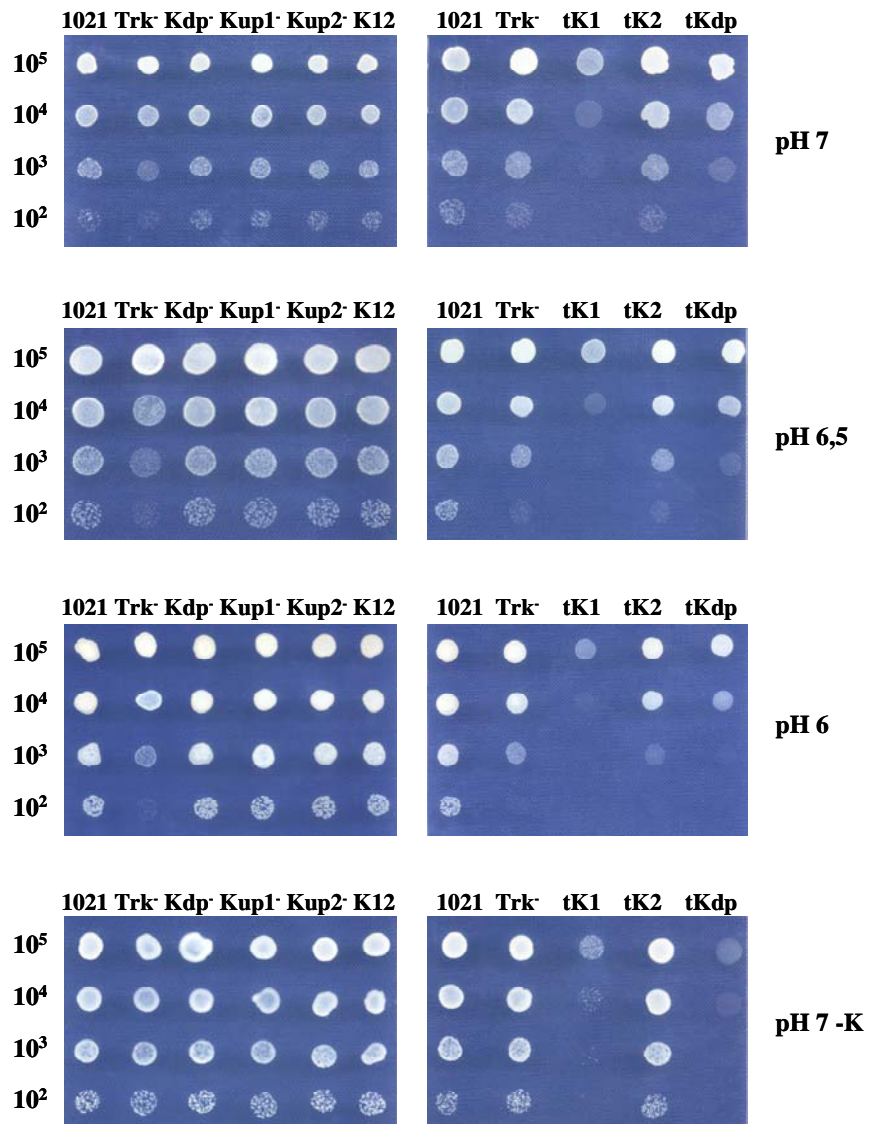


Figura R2.13.- Crecimiento en medio mínimo sólido adicionado de 300 mM NaCl al pH que se indica a la derecha de los mutantes de *S. meliloti* en genes de sistemas de transporte de potasio. Cada gota contiene aproximadamente el número de ufc indicado a la izquierda. Las columnas corresponden a la cepa que se señala en la parte superior de la imagen. **K12:** Kup1⁻, Kup2⁻; **tK1:** Trk⁻, Kup1⁻; **tK2:** Trk⁻, Kup2⁻; **tKdp:** Trk⁻, Kdp⁻.

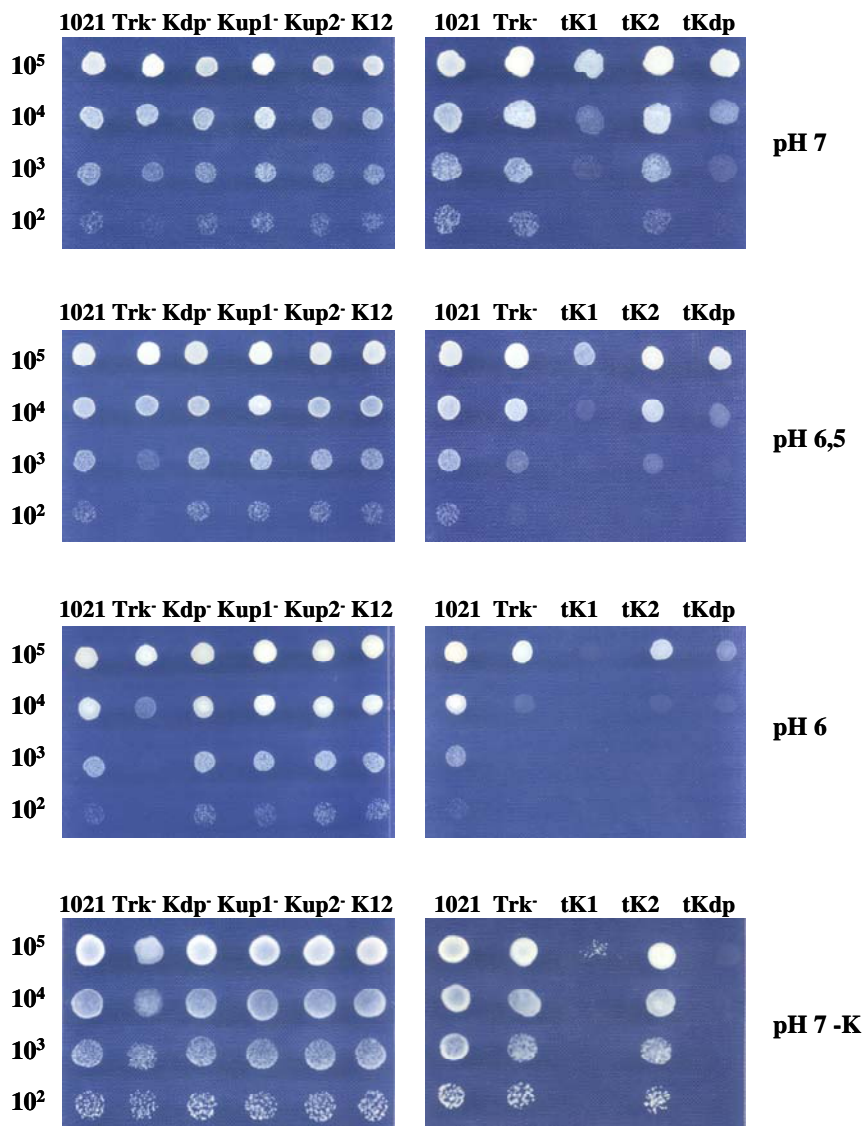


Figura R2.14.- Crecimiento en medio mínimo sólido adicionado de 400 mM de NaCl al pH que se indica a la derecha de los mutantes de *S. meliloti* en genes de sistemas de transporte de potasio. En cada fila, las gotas contienen aproximadamente el número de ufc indicado a la izquierda. Cada columna corresponde a la cepa que se señala en la parte superior de la imagen.

K12: Kup1⁻, Kup2⁻; **tK1:** Trk⁻, Kup1⁻; **tK2:** Trk⁻, Kup2⁻; **tKdp:** Trk⁻, Kdp⁻.

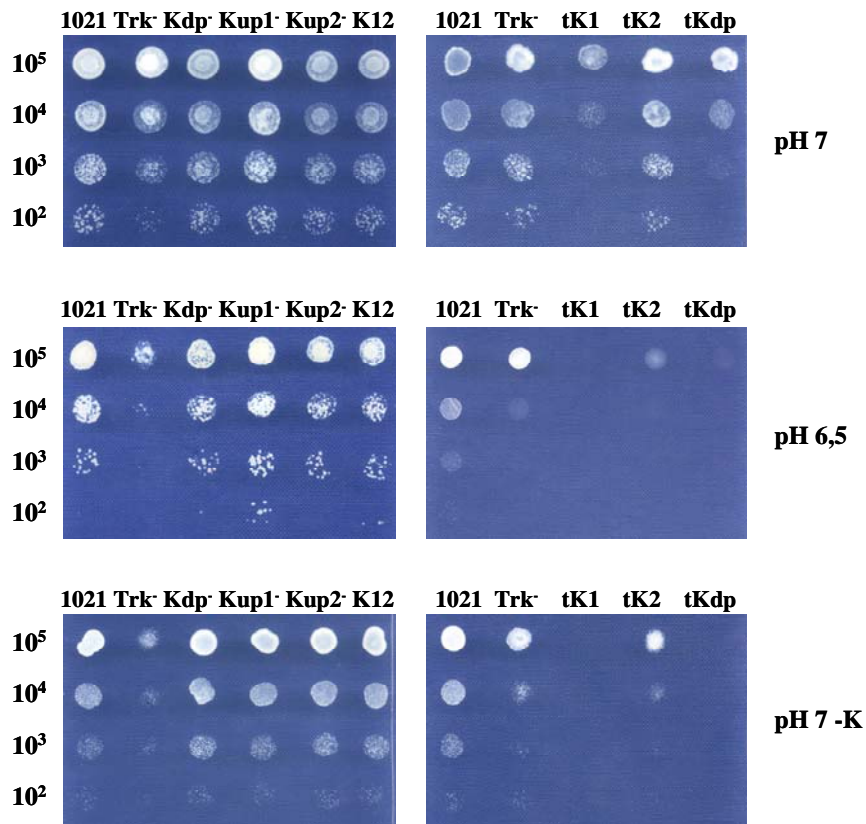


Figura R2.15.- Crecimiento en medio mínimo sólido adicionado de 500 mM de NaCl al pH que se indica a la derecha de los mutantes de *S. meliloti* en genes de sistemas de transporte de potasio. Cada gota contiene aproximadamente el número de ufc indicado a la izquierda. Cada columna corresponde a la cepa que se señala en la parte superior de la imagen.
K12: Kup1⁻, Kup2⁻; **tK1:** Trk⁻, Kup1⁻; **tK2:** Trk⁻, Kup2⁻; **tKdp:** Trk⁻, Kdp⁻.

Tal y como se había observado en medio líquido, la adición de sacarosa tuvo un efecto menor sobre el crecimiento de los mutantes que la de NaCl, aunque las tendencias que se observaron fueron las mismas en ambos casos.

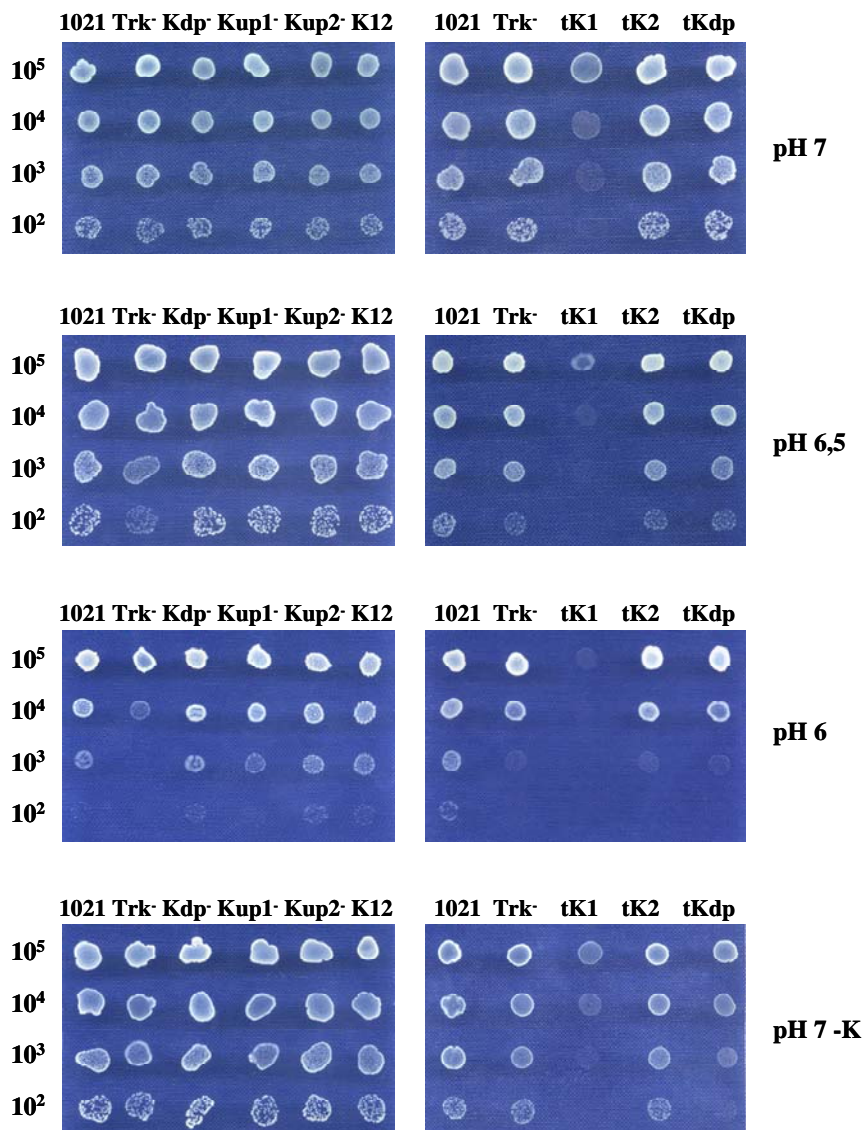


Figura R2.16.- Crecimiento en medio mínimo sólido adicionado de 500 mM de sacarosa al pH que se indica a la derecha de los mutantes de *S. meliloti* en genes de sistemas de transporte de potasio. Cada gota contiene aproximadamente el número de ufc indicado a la izquierda. Cada columna corresponde a la cepa que se señala en la parte superior de la imagen.

K12: Kup1⁻, Kup2⁻; **tK1:** Trk⁻, Kup1⁻; **tK2:** Trk⁻, Kup2⁻; **tKdp:** Trk⁻, Kdp⁻.

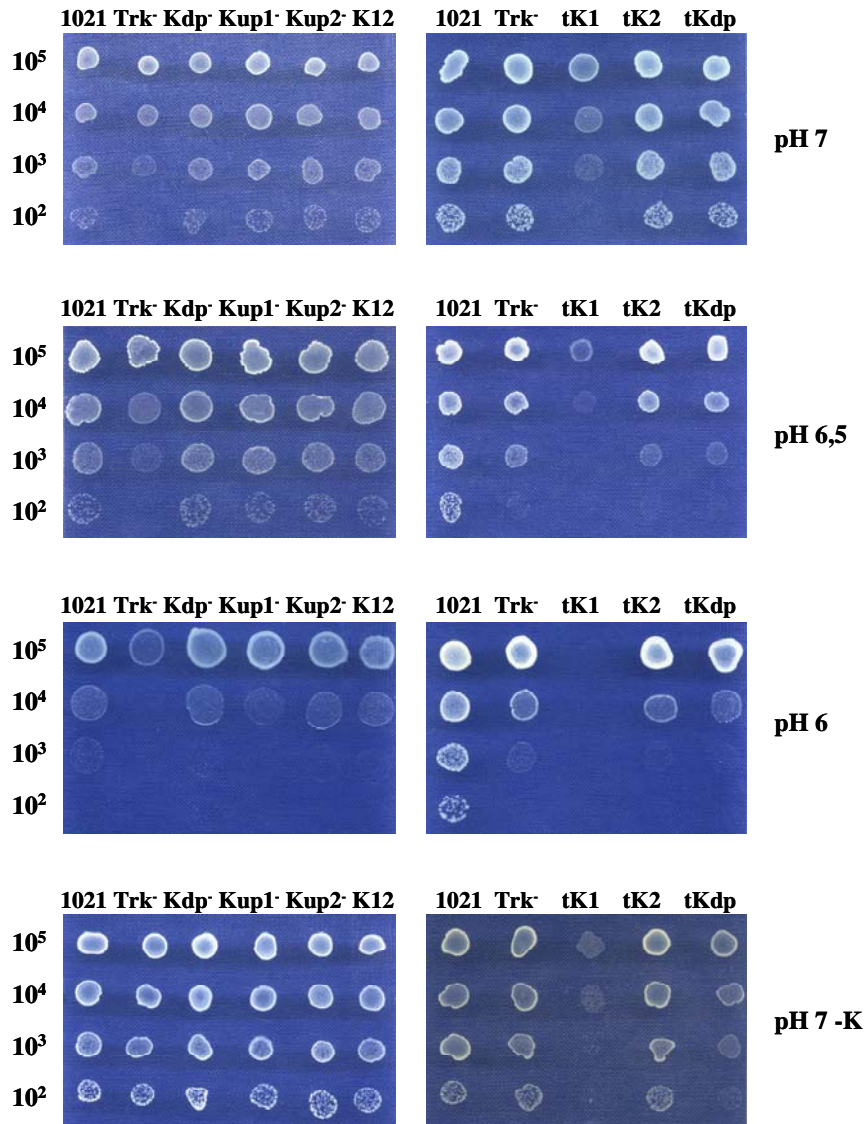


Figura R2.17.- Crecimiento en medio mínimo sólido adicionado de 600 mM de sacarosa al pH que se indica a la derecha de los mutantes de *S. meliloti* en genes de sistemas de transporte de potasio. Cada gota contiene aproximadamente el número de ufc indicado a la izquierda. Cada columna corresponde a la cepa que se señala en la parte superior de la imagen.

K12: Kup1⁻, Kup2⁻; **tK1:** Trk⁻, Kup1⁻; **tK2:** Trk⁻, Kup2⁻; **tKdp:** Trk⁻, Kdp⁻.

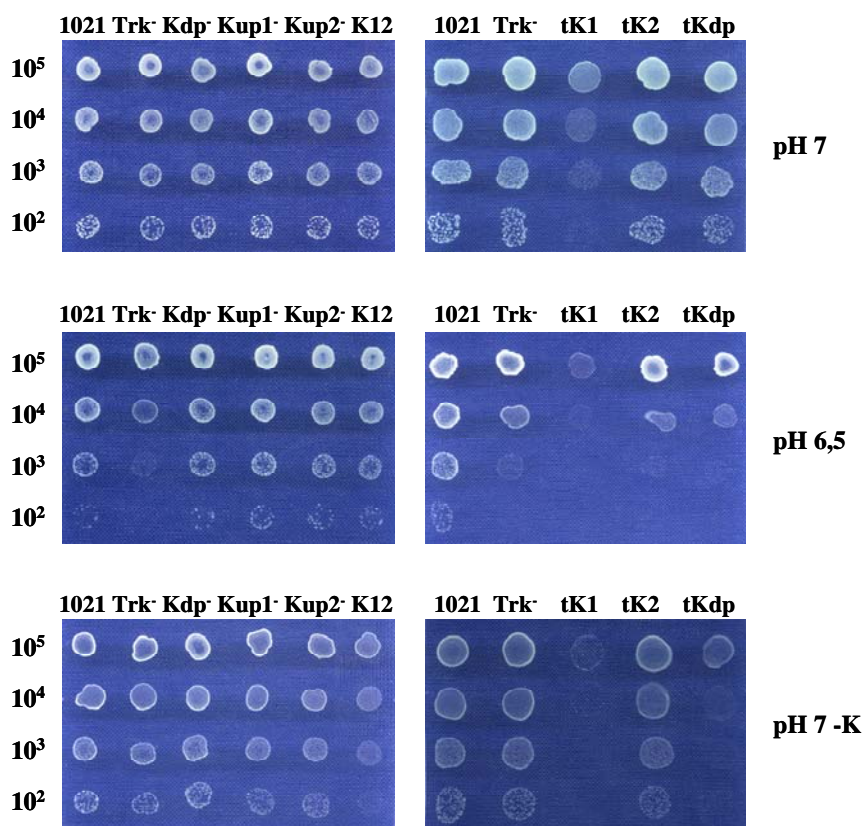


Figura R2.18.- Crecimiento en medio mínimo sólido adicionado de 700 mM de sacarosa al pH que se indica a la derecha de los mutantes de *S. meliloti* en genes de sistemas de transporte de potasio. Cada gota contiene aproximadamente el número de ufc indicado a la izquierda. Cada columna corresponde a la cepa que se señala en la parte superior de la imagen.

K12: Kup1⁻, Kup2⁻; **tK1:** Trk⁻, Kup1⁻; **tK2:** Trk⁻, Kup2⁻; **tKdp:** Trk⁻, Kdp⁻.

Los resultados obtenidos en medio sólido confirman lo observado en medio líquido. El mutante Trk⁻ es el único mutante simple que se encuentra afectado por la adición de solutos y en medio sólido puede apreciarse que este efecto es más acusado a bajo pH (Fig. R2.13 a R2.18). A pesar de que el sistema Kup se ha descrito como un sistema que actúa durante la adaptación a estrés a bajo pH (Zakharyan y Trchounian, 2001), no se

observaron deficiencias en el crecimiento de los mutantes carentes de Kup1 o Kup2 o del doble mutante 10K1K2 a pH ácido.

Como ya señalamos, el doble mutante 10tAK1 (Trk⁻, Kup1⁻) presentó graves problemas de crecimiento en condiciones no estresantes, especialmente a pH ácido. La adición de solutos produjo una visible inhibición de su crecimiento a pH 7 y en el medio con bajo contenido de potasio. La inhibición del crecimiento de esta cepa a los pHs más bajos impide determinar el efecto de la adición de solutos en esas condiciones.

Curiosamente, el doble mutante 10tAK2 (Trk⁻, Kup2⁻) no presentó ninguna diferencia respecto al simple mutante 10tAG (Trk⁻) en medio sólido, aunque en medio líquido sí pudimos observar un efecto de la doble mutación por lo que es posible que en medio sólido el sistema Kup2 no sea tan activo como en medio líquido.

Puesto que el sistema Kdp se considera un sistema implicado en la captación de potasio en medios con bajo contenido de este catión (Sleator y Hill, 2001), se esperaba que su mutación se encontrara asociada a un efecto en estas condiciones. Sin embargo, la mutación del sistema Kdp sólo se asocia a un fenotipo cuando también falta el sistema Trk y, en este caso, dicho fenotipo es visible ante la adición de NaCl aunque no de sacarosa, a los distintos pHs utilizados. En el medio con bajo contenido en potasio el mutante 10tAKdp (Trk⁻, Kdp⁻) se vio incluso más afectado por la adición de NaCl que 10tAK1 (Trk⁻, Kup1⁻), probablemente porque en estas condiciones la actividad del sistema Kdp aumenta permitiendo la captación de potasio necesaria para el crecimiento celular.

2.4 Comportamiento simbiótico de los mutantes de *S. meliloti* 1021

Todos los mutantes en sistemas de transporte de potasio de *S. meliloti* fueron capaces de formar nódulos fijadores de nitrógeno en raíces de plantas de alfalfa (*Medicago sativa* var. Aragón). Con estos mutantes se llevaron a cabo experimentos de infectividad y, en el caso de los mutantes simples 10tAG (Trk⁻) y 10K1K (Kup1⁻), también se determinó su eficiencia en la fijación de nitrógeno.

2.4.1. Infectividad de los mutantes en sistemas de transporte de potasio

Las plantas de alfalfa se inocularon con unas 10^6 ufc/ml y se determinó la cinética de nodulación de los distintos mutantes a lo largo de unos 30 días. Las cinéticas de nodulación de los mutantes simples y el doble mutante 10K1K2 ($Kup1^-$, $Kup2^-$) se presentan en la figura R2.19. Ninguno de estos mutantes mostraron diferencias apreciables con la cepa parental *S. meliloti* 1021.

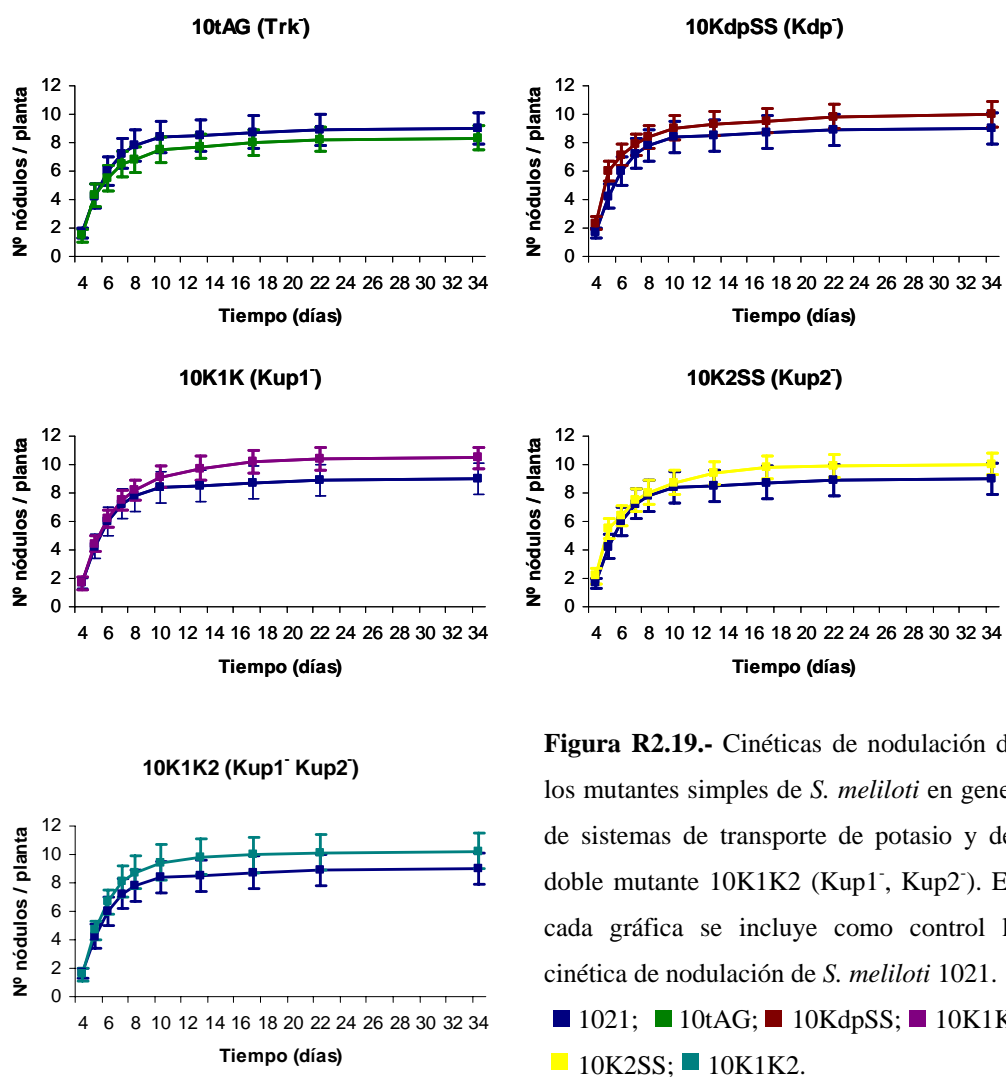


Figura R2.19.- Cinéticas de nodulación de los mutantes simples de *S. meliloti* en genes de sistemas de transporte de potasio y del doble mutante 10K1K2 ($Kup1^-$, $Kup2^-$). En cada gráfica se incluye como control la cinética de nodulación de *S. meliloti* 1021.

■ 1021; ■ 10tAG; ■ 10KdpSS; ■ 10K1K; ■ 10K2SS; ■ 10K1K2.

Por otra parte, se presentan las cinéticas de nodulación en las que se comparan los dobles mutantes obtenidos a partir de 10tAG (Trk^-) y los triples mutantes obtenidos a partir de 10tAK1 (Trk^- , $Kup1^-$) con la cepa parental *S. meliloti* 1021 (Fig. R2.20).

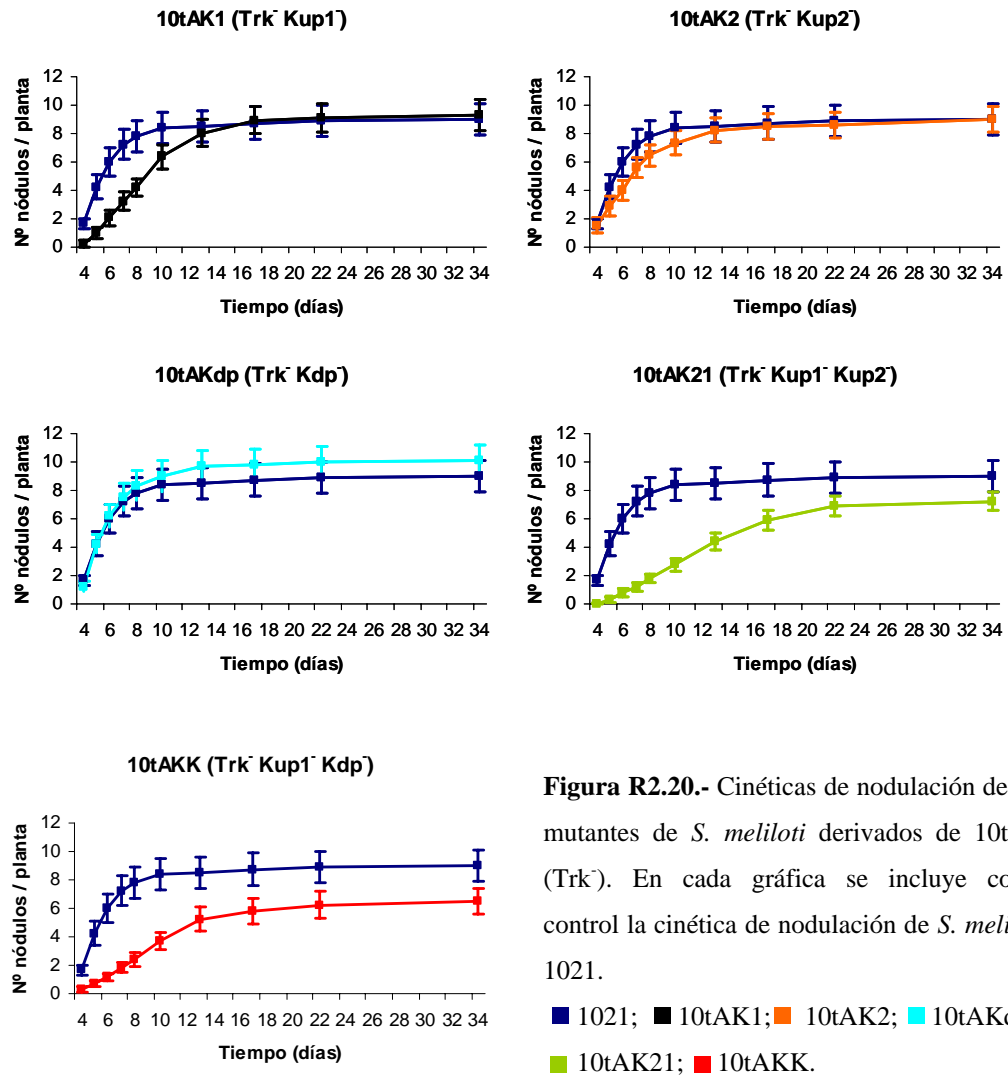


Figura R2.20.- Cinéticas de nodulación de los mutantes de *S. meliloti* derivados de 10tAG (Trk⁻). En cada gráfica se incluye como control la cinética de nodulación de *S. meliloti* 1021.

■ 1021; ■ 10tAK1; ■ 10tAK2; ■ 10tAKdp; ■ 10tAK21; ■ 10tAKK.

Entre todos los mutantes ensayados, sólo el doble mutante 10tAK1 (Trk⁻, Kup1⁻) y los dos triples mutantes 10tAKK (Trk⁻, Kup1⁻, Kdp⁻) y 10tAK21 (Trk⁻, Kup1⁻, Kup2⁻) mostraron diferencias respecto a la cepa parental en su infectividad. El mutante doble 10tAK1 indujo la formación de un número de nódulos por planta significativamente menor que la cepa parental según un test de ANOVA hasta los 11 días tras la inoculación, momento en el que la eficiencia en formación de nódulos se igualó con la de la cepa parental. Los mutantes triples no llegaron a alcanzar los niveles de nodulación de la cepa parental hasta el día 22 tras la inoculación. Es necesario señalar

que debido a la gran dificultad de los triples mutantes para crecer en medio líquido, fue necesario inocular las plantas con una suspensión preparada a partir de células crecidas en medio sólido en lugar de utilizar un preinóculo como se describe en la sección de material y métodos. Sin embargo, podemos asegurar que la menor capacidad infectiva de estos mutantes no fue debida a falta de viabilidad celular, ya que se llevaron a cabo recuentos de células viables en la solución del cultivo hidropónico que resultaron ser semejantes a los de la cepa parental *S. meliloti* 1021 en todos los casos (datos no mostrados). Además, y dada la tendencia de estos mutantes a formar colonias revertientes en medio sólido, se llevaron a cabo aislamientos a partir de los nódulos, lo que permitió determinar que dichos nódulos fueron producidos por los mutantes utilizados y no por posibles revertientes. Así, podemos concluir que los mutantes triples estudiados fueron capaces de producir nódulos fijadores de nitrógeno aunque presentaron una cinética de nodulación muy retrasada respecto a la cepa parental.

2.4.2. Eficiencia simbiótica de los mutantes 10K1K y 10tAG

Los resultados obtenidos en cuanto a capacidad de crecimiento, indicaban que el principal sistema implicado en la captación de potasio en respuesta a estrés osmótico era el Trk. Además, parece claro que Kup1 también resulta esencial en la captación de dicho catión tanto en condiciones no estresantes como en medios hiperosmóticos, ya que un doble mutante en ambos sistemas se encuentra muy afectado en su capacidad de crecimiento, así como en la eficiencia de formación de nódulos. Por este motivo, se decidió estudiar con más detalle las propiedades simbióticas de los mutantes simples 10K1K (Kup1⁻) y 10tAG (Trk⁻).

Para determinar la eficiencia simbiótica de los mutantes 10K1K (Kup1⁻) y 10tAG (Trk⁻), se utilizó un sistema de jarras Leonard con vermiculita como sustrato. Las plantas se cosecharon 7 semanas después de la inoculación, se determinó el peso seco de la parte aérea, se contaron los nódulos formados y se analizó la capacidad fijadora de nitrógeno por nódulo determinando la actividad reductora de acetileno (Fig. R2.21).

Este experimento también se llevó a cabo en condiciones de estrés hiperosmótico causado por la adición de NaCl hasta una concentración final de 75 mM, en la solución de riego a partir de la tercera semana después de la inoculación (Fig. R2.21).

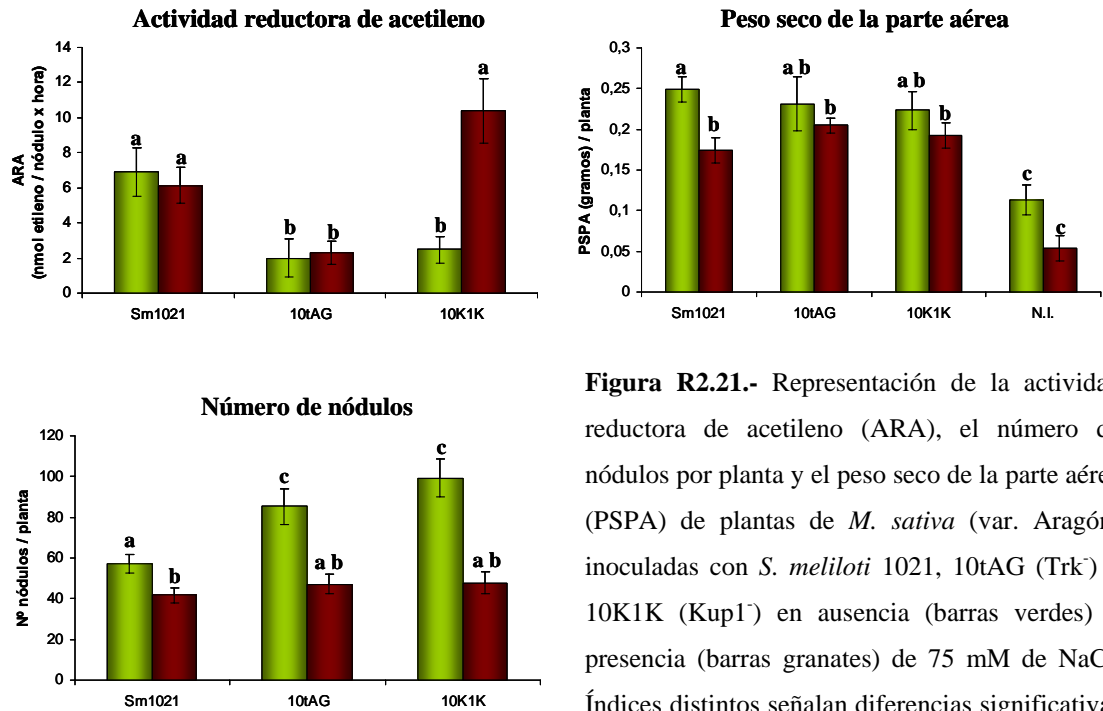


Figura R2.21.- Representación de la actividad reductora de acetileno (ARA), el número de nódulos por planta y el peso seco de la parte aérea (PSPA) de plantas de *M. sativa* (var. Aragón) inoculadas con *S. meliloti* 1021, 10tAG (Trk⁻) o 10K1K (Kup1⁻) en ausencia (barras verdes) o presencia (barras granates) de 75 mM de NaCl. Índices distintos señalan diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor (P<0,05).

Se pudo observar que el mutante 10K1K (Kup1⁻) presentó una deficiencia en su capacidad de fijación de nitrógeno medida como actividad reductora de acetileno en ausencia de NaCl. Sin embargo, el peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas con este mutante fue semejante al de la cepa parental lo que puede explicarse porque en condiciones no estresantes el mutante 10K1K produjo un número de nódulos significativamente superior a la cepa parental, algo que no había sido observado en su cinética de nodulación en tubos (Fig. R2.19).

En el caso del mutante *Trk⁻*, la actividad reductora de acetileno fue significativamente inferior a la de la cepa parental tanto en condiciones estresantes como no estresantes. También este mutante dio lugar a un mayor número de nódulos que la cepa parental en condiciones no estresantes, lo que de nuevo podría explicar que el peso de la planta no se vea afectado por la deficiencia en la fijación de nitrógeno observada. Sin embargo, las plantas inoculadas con el mutante 10tAG y sometidas a un estrés hiperosmótico formaron un número de nódulos semejante al de plantas inoculadas con la cepa parental en estas condiciones y tampoco pudieron apreciarse diferencias en el peso seco de su parte aérea, a pesar de que la actividad reductora de acetileno fue más baja en los nódulos formados por la cepa mutante.

2.5 Capacidad de osmoadaptación en vida libre de mutantes en sistemas de transporte de potasio de *M. loti*

2.5.1. Crecimiento de los mutantes de *M. loti* MAFF303099 en medio líquido

Para la determinación de la capacidad de osmoadaptación de los mutantes de *M. loti* en sistemas de transporte de potasio, se llevaron a cabo curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 150 mM NaCl, 200 mM NaCl, 300 mM sacarosa, 400 mM sacarosa y 500 mM sacarosa con cada uno de los dos mutantes obtenidos (Fig. R2.22 y R2.23).

Cada tubo se inoculó con 10^6 - 10^7 ufc de la cepa de interés y el crecimiento se estableció como una función de la DO_{600nm} medida a lo largo de 100-200 horas. En todos los casos se incluyó la cepa parental (*M. loti* MAFF303099) como referencia y se llevó a cabo simultáneamente una curva de crecimiento en medio mínimo como control.

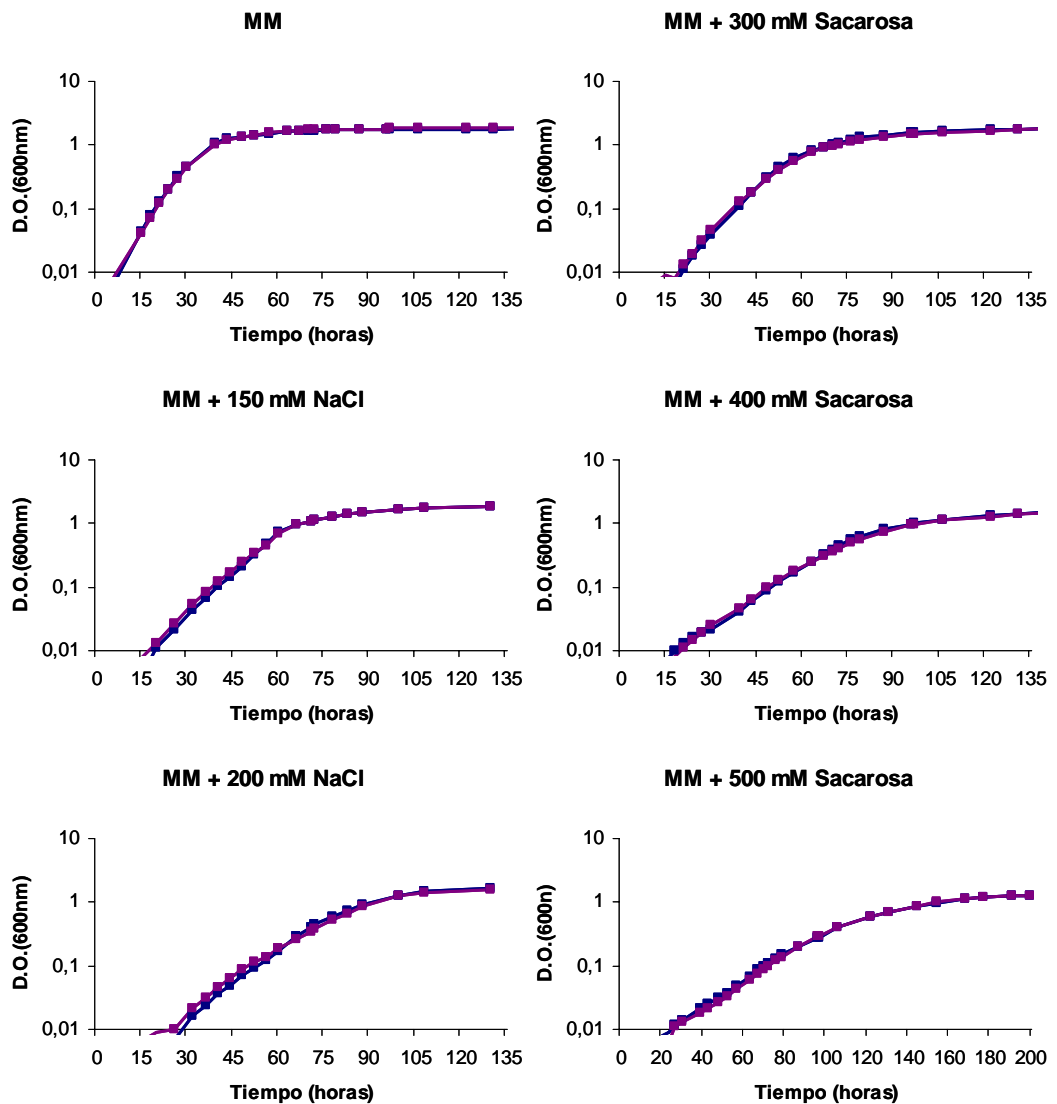


Figura R2.22.- Curvas de crecimiento de MKdpT (K_{dp}^-) en medio mínimo adicionado de distintas concentraciones de NaCl o sacarosa según se indica. En cada gráfica se incluye como control la curva de crecimiento de la cepa parental *M. loti* MAFF303099.

■ MAFF303099; ■ MKdpT.

En la figura R2.22 se puede observar que el mutante MKdpT presentó una capacidad de crecimiento idéntica a la de la cepa parental en todas las condiciones ensayadas.

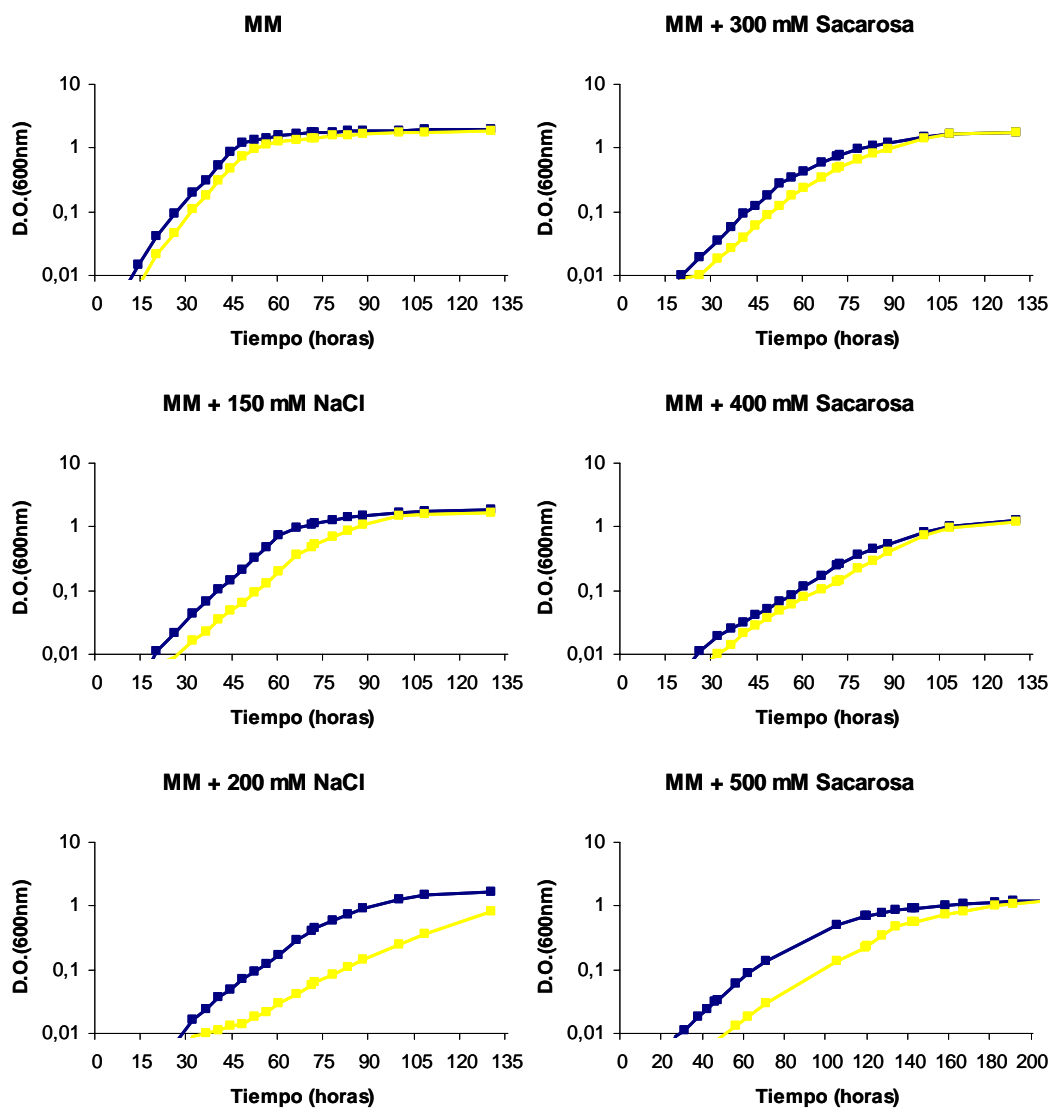


Figura R2.23.- Curvas de crecimiento de MKup2 (Kup2⁻) en medio mínimo adicionado de distintas concentraciones de NaCl o sacarosa según se indica. En cada gráfica se incluye como control la curva de crecimiento de la cepa parental *M. loti* MAFF303099.

■ MAFF303099; ■ MKup2.

Como ya indicamos con anterioridad, el mutante MKup2 presentó ligeras dificultades de crecimiento ya en medio mínimo no adicionado de NaCl o sacarosa (Fig. R2.23). Sin embargo, las diferencias de crecimiento con la cepa parental fueron mínimas en estas condiciones.

En el mutante MKup2, la adición de sacarosa al medio de cultivo sólo tuvo un efecto inhibitorio a altas concentraciones (500 mM) mientras que el leve retraso que se aprecia a concentraciones más bajas es comparable con el que esta cepa presenta en medio mínimo. En cambio, cuando se añadió NaCl al medio, se produjo una inhibición del crecimiento del mutante evidente ya a la concentración más baja empleada y el retraso aumentó claramente en medio con 200 mM NaCl.

2.5.2. Crecimiento de los mutantes de *M. loti* MAFF303099 en medio sólido

La capacidad de osmoadaptación de los mutantes MKdpT y MKup2 se determinó también sobre placas de medio mínimo tamponado con una combinación de Tris y MES (5 mM) a pH 6, pH 6,5 o pH 7. Además, se utilizó también un medio con bajo contenido de potasio y tamponado a pH 7. La cepa parental, *M. loti* MAFF303099, se incluyó en todas las placas como referencia y se utilizó como control el correspondiente medio sin NaCl o sacarosa añadidos (Fig. R2.24).

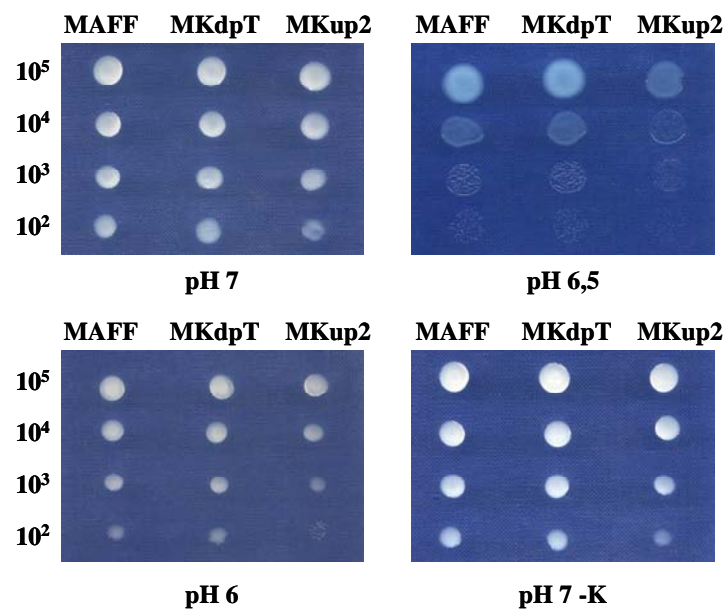


Figura R2.24.- Crecimiento en medio mínimo sólido al pH que se señala, de los mutantes de *M. loti* en sistemas de transporte de potasio. Cada gota contiene aproximadamente el número de ufc indicado a la izquierda. Las columnas corresponden a la cepa que se indica en la parte superior de la imagen. MAFF: MAFF303099.

Para cada uno de los pHs utilizados se prepararon placas con 100 mM, 150 mM y 175 mM NaCl (Fig. R2.25), o 300 mM, 400 mM y 500 mM sacarosa (Fig. R2.26).

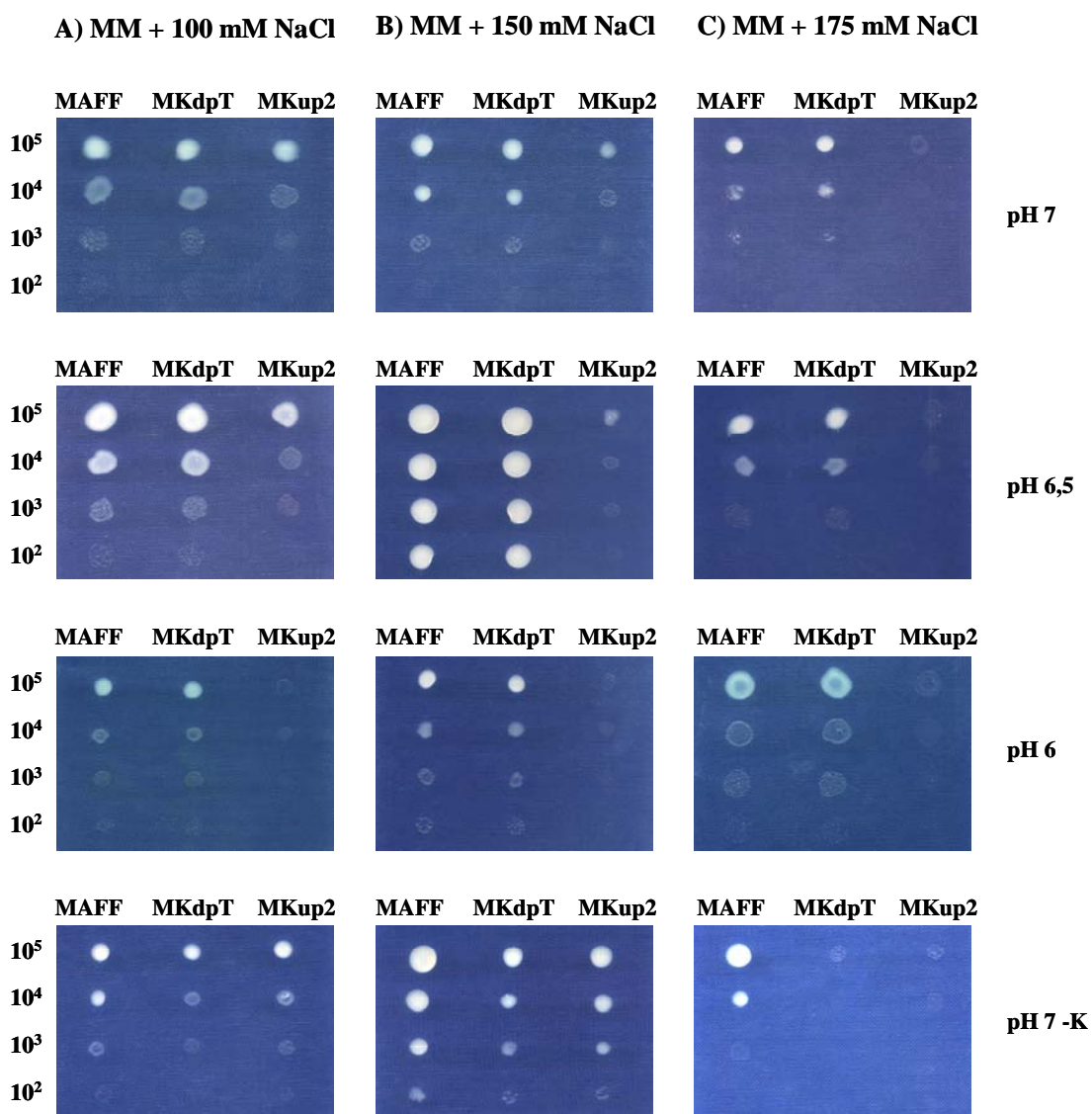


Figura R2.25.- Crecimiento en medio mínimo sólido adicionado de distintas concentraciones de NaCl al pH que se señala, de los mutantes de *M. loti* en sistemas de transporte de potasio. Cada gota contiene aproximadamente el número de ufc indicado a la izquierda. Las columnas corresponden a la cepa que se señala en la parte superior de la imagen. MAFF: MAFF303099.

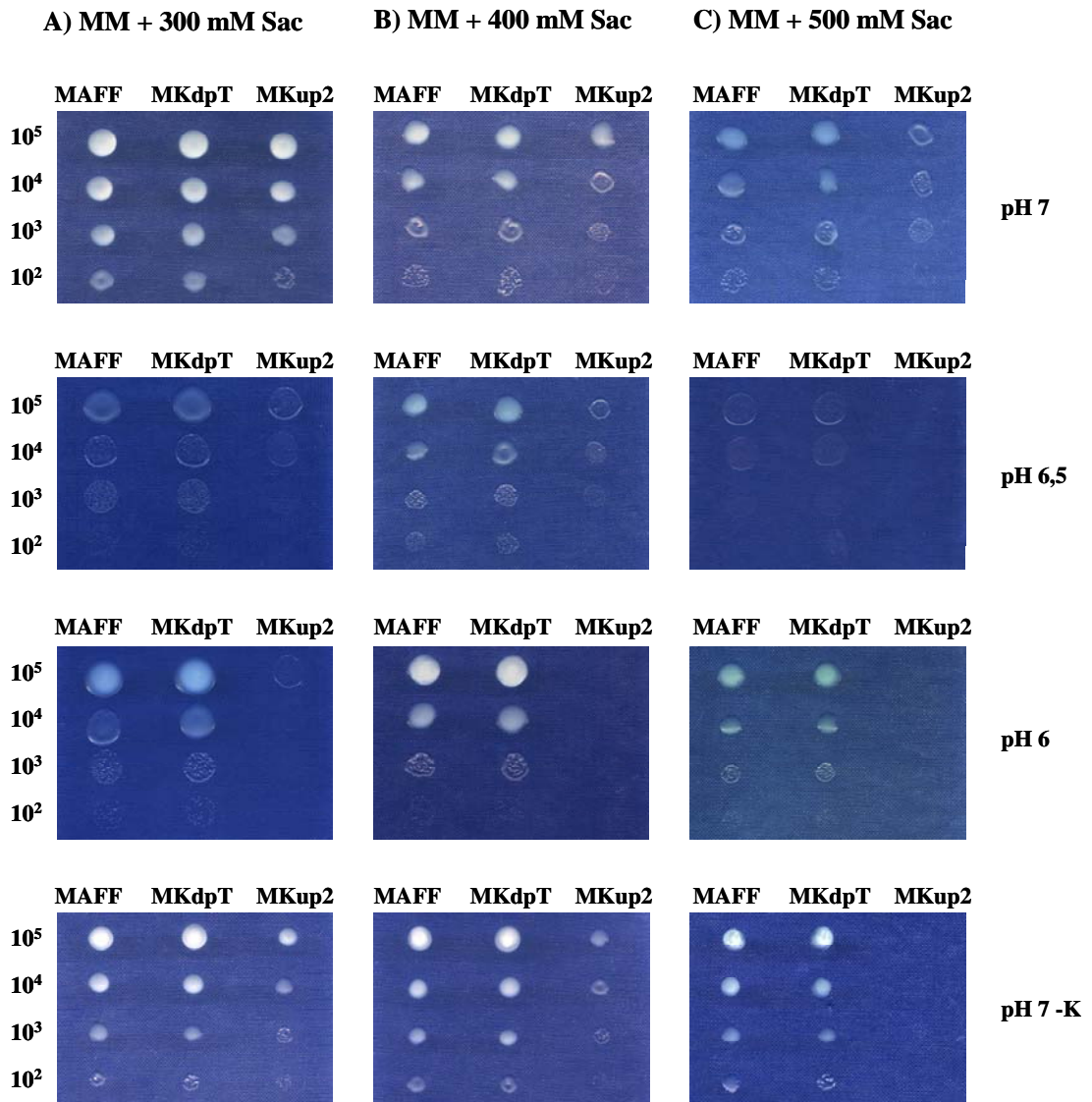


Figura R2.26.- Crecimiento en medio mínimo sólido adicionado de distintas concentraciones de sacarosa (Sac) al pH que se señala, de los mutantes de *M. loti* en sistemas de transporte de potasio. Cada gota contiene aproximadamente el número de ufc indicado a la izquierda. Las columnas corresponden a la cepa señalada en la parte superior de la imagen. **MAFF:** MAFF303099.

Como ya dijimos se pudo apreciar un ligero retraso en el crecimiento del mutante MKup2 ya en condiciones no estresantes, especialmente a pH ácido, pero las diferencias se extremaron cuando se adicionó al medio NaCl o sacarosa. Las diferencias respecto a la cepa parental fueron más acusadas a pHs inferiores a 7 aunque pudieron detectarse desde un primer momento ante la adición de bajas concentraciones de NaCl o sacarosa incluso a pH 7.

El mutante MKdpT se comportó exactamente igual que la cepa parental en medio mínimo a cualquiera de los tres pHs ensayados. Sin embargo, presentó claras deficiencias en su capacidad de crecimiento en medio con bajo contenido de potasio ante la adición de NaCl (Fig. R2.25). Es interesante señalar que estas condiciones también tuvieron un efecto negativo sobre el crecimiento del mutante MKup2, lo que indica que ambos sistemas son funcionales y actúan en la adaptación a estrés salino en presencia de bajas concentraciones de potasio en el medio. Por otra parte, parece que la adición de sacarosa no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento del mutante MKdpT, ni siquiera en el medio con bajo contenido en potasio (Fig. R2.26).

Estos datos indican que el sistema Kup2 es muy importante en todas las condiciones ensayadas para la adaptación de la bacteria a estrés osmótico e incluso para su crecimiento en condiciones no estresantes. En cambio, el sistema Kdp responde exclusivamente a un estrés iónico en medios con bajo contenido de potasio.

2.6 Comportamiento simbiótico de los mutantes de *M. loti* MAFF303099

Los dos mutantes en sistemas de transporte de potasio de *M. loti* fueron capaces de establecer simbiosis fijadoras de nitrógeno con plantas de *Lotus tenuis*. Para determinar la eficiencia simbiótica de estos mutantes, se utilizó un sistema de jarras Leonard. Las plantas se cosecharon 6 semanas después de la inoculación, se pesó la parte aérea, se contaron los nódulos formados y se determinó la actividad reductora de acetileno por nódulo (Fig. R2.27).

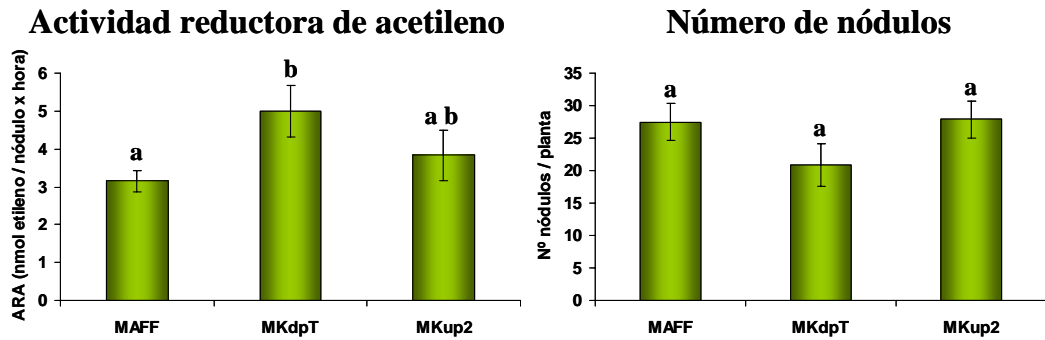
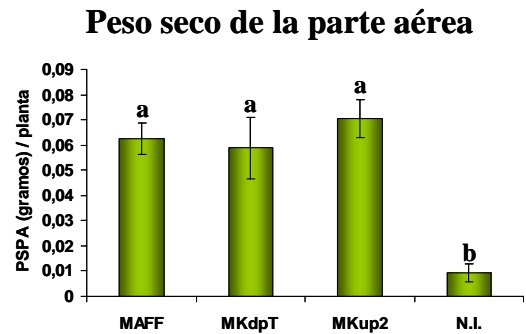


Figura R2.27.- Representación de la actividad reductora de acetileno (ARA), el número de nódulos por planta y el peso seco de la parte aérea (PSPA) de plantas de *L. tenuis* inoculadas con *M. loti* MAFF303099, MKdpT o MKup2, según se indica (**MAFF**: MAFF303099). Índices distintos señalan diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ($P < 0,05$).



El mutante MKup2 presentó en todos los casos un comportamiento estadísticamente igual al de la cepa parental MAFF303099. El mutante MKdpT también se comportó de manera semejante a la cepa parental y aunque la actividad reductora de acetileno por nódulo fue ligeramente superior en las plantas inoculadas con este mutante, la actividad por planta fue estadísticamente igual que la obtenida utilizando MAFF303099 ya que el número de nódulos tendió a ser un poco más bajo (datos no mostrados).

Discusión: Capítulo 2

El potasio es un catión muy abundante en todos los organismos vivos y actúa en la regulación de diversas funciones celulares por lo que las actividades de captación y eflujo de este compuesto se encuentran altamente controladas por las células vivas y se producen a través de sistemas especializados en respuesta a distintas condiciones medioambientales. La captación de potasio constituye una de las respuestas más rápidas y más ampliamente extendidas entre los microorganismos durante el proceso de adaptación a un aumento de la osmolaridad del medio (Sleator y Hill, 2001).

En la literatura se suelen considerar los sistemas Kdp y Trk como los dos sistemas de captación de potasio más importantes en procariotas. Se han encontrado homólogos al sistema de transporte de alta afinidad Kdp en numerosas bacterias. Este sistema parece estar ausente sólo en organismos procedentes de ambientes en los que se pueden encontrar sistemáticamente elevadas cantidades de este catión, como por ejemplo los ambientes marinos y salinos en los que el potasio se encuentra normalmente presente en concentraciones iguales o superiores a 10 mM (Kraegeloh *et al.*, 2005).

En todos aquellos rizobios cuya secuencia genómica es conocida, se han encontrado evidencias de la presencia de un sistema de transporte Kdp. Por el contrario, la presencia de genes homólogos al sistema Trk es algo excepcional entre estas bacterias y sólo parecen encontrarse en el genoma en *S. meliloti* 1021 (Galibert *et al.*, 2001). En esta bacteria se han identificado componentes de los tres tipos de sistemas de transporte de potasio presentes en *Escherichia coli*: Kdp, Trk y Kup. De hecho, se encuentran dos copias del gen *kup* en el genoma de *S. meliloti*. La presencia de varios sistemas Kup parece ser algo habitual entre los rizobios. Se han anotado dos genes que codifican sistemas Kup en *M. loti* MAFF303099 (Kaneko *et al.*, 2000), tres en *Rhizobium etli* CFN42 (González *et al.*, 2006), *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (Young *et al.*, 2006), *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (Kaneko *et al.*, 2002) y *Bradyrhizobium* sp. ORS278; y hasta cuatro en *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 (Giraud *et al.*, 2007).

En *E. coli* Kup es un sistema de transporte de potasio de baja afinidad con una implicación minoritaria en la captación de dicho catión en las condiciones de crecimiento habituales. Este sistema parece específicamente implicado en la captación de potasio durante la adaptación a condiciones de estrés hiperosmótico a bajo pH

(Trchounian y Kobayashi, 1999). Se sabe sin embargo que la mutación de un gen con elevada homología al sistema Kup en *R. tropici* conlleva una disminución de su capacidad de crecimiento en presencia de NaCl o sacarosa en medio TY (Nogales *et al.*, 2002). Esto, junto con la aparente ausencia de un sistema Trk en la mayoría de los rizobios cuyo genoma se conoce, indica que la implicación de los distintos sistemas de transporte de potasio en la adaptación a estrés osmótico en estas bacterias varía respecto a lo observado en *E. coli*.

El estudio de los sistemas de transporte de potasio en los rizobios y de su relación con la capacidad de adaptación a estrés osmótico de estas bacterias resulta complejo debido al alto número de transportadores codificados en su genoma. En este trabajo se describe la obtención de mutantes inactivados en distintos sistemas de transporte de potasio presentes en el genoma de *S. meliloti* 1021 (Galibert *et al.*, 2001) y *M. loti* MAFF303099 (Kaneko *et al.*, 2000). Así, se obtuvieron mutantes simples en cada uno de los cuatro transportadores de *S. meliloti* 1021 y hasta cuatro mutantes dobles y dos mutantes triples en los que varios sistemas se encontraban inactivos. La mutación simultánea de los sistemas Trk y Kup1 de esta bacteria en la cepa 10tAK1 condujo a una deficiencia clara de su crecimiento en condiciones de laboratorio y los dos mutantes triples obtenidos a partir de ella se encontraron gravemente afectados en su capacidad para crecer incluso en medio rico. Los problemas de crecimiento que presentaron estas cepas se podrían relacionar con una deficiencia en la homeostasis del potasio. Puesto que este catión se encuentra normalmente presente en el medio de cultivo y es necesario para diversos procesos celulares, las dificultades derivadas de la incapacidad de la cepa para transportarlo pueden provocar el retraso en el crecimiento que observamos y que no tendría por qué relacionarse con procesos de adaptación a estrés. La ausencia de un sistema Trk en *M. loti* MAFF303099 podría explicar la imposibilidad de obtener un mutante de esta bacteria que careciese de ambos genes *kup*. Pudimos no obstante construir un mutante simple en el que se inactivó el sistema Kup2 y que presentó algunas dificultades para crecer en las condiciones normales de laboratorio.

Los problemas de crecimiento presentados por los mutantes descritos indican claramente que los sistemas de transporte inactivados actúan efectivamente durante el

crecimiento celular en las condiciones de estrés ensayadas. Esto incluye como mínimo el sistema Kup2 de *M. loti* y los cuatro sistemas de *S. meliloti*, aunque en el caso de los sistemas Kdp y Kup2 su actividad parece ser mínima ya que sólo se pudo asociar un efecto a su mutación cuando alguno de los otros dos sistemas de transporte presentes en la bacteria se encontraban inutilizados.

Las graves deficiencias de crecimiento que presentaron los mutantes de *S. meliloti* en los que se encontraban inactivados los sistemas Trk y Kup1 impiden comparar de un modo adecuado la respuesta de estos mutantes frente a la aplicación de un estrés osmótico con la de la cepa parental. Los estudios realizados sobre la capacidad de crecimiento en condiciones de estrés con las otras cepas muestran una clara implicación del sistema Trk en la superación del estrés inducido por la presencia de NaCl o sacarosa en el medio. Sin embargo, ni el mutante en *kup1* ni el doble mutante en ambos sistemas Kup presentó diferencias en su capacidad de crecimiento respecto a la cepa parental en presencia de ninguno de estos compuestos. Se sabe que el sistema Kup es el principal responsable de la captación de potasio por *E. coli* en condiciones de estrés hiperosmótico a bajo pH (Zakharyan y Trchounian, 2001) y se cree que, tal y como ocurre con los sistemas de extrusión de sodio, esta bacteria podría utilizar distintos transportadores según el pH del medio. Ante la posibilidad de que una situación semejante se diera en *S. meliloti*, se determinó la capacidad de crecimiento de los mutantes obtenidos a distintos pHs y en presencia de NaCl o sacarosa. Sin embargo, ninguna de las condiciones ensayadas provocó diferencias entre el crecimiento de los mutantes 10K1K (Kup1⁻) o 10K1K2 (Kup1⁻, Kup2⁻) y la cepa parental. Se pudo observar, no obstante, que una disminución del pH aumenta el efecto de la mutación del sistema Trk sobre la capacidad de osmoadaptación de la bacteria. Estos datos sugieren que el sistema Trk se mantiene activo a los pHs ensayados y es el principal responsable de la captación de potasio en respuesta a estrés hiperosmótico en todos los casos. Estas observaciones no descartan la posible implicación del sistema Kup1 en el proceso de osmoadaptación ya que la actividad del sistema Trk parece ser suficiente para permitir el crecimiento celular en condiciones de estrés enmascarando una posible participación del sistema Kup1 pero la inactivación simultánea de ambos sistemas provoca una

inhibición del crecimiento que impide comparar la respuesta osmoadaptativa del mutante con la de la cepa parental.

Los sistemas de transporte de potasio Kdp y Kup2 parecen intervenir en el transporte de este catión de un modo minoritario en las condiciones de crecimiento habituales. Su mutación tiene un efecto aditivo sobre el fenotipo presentado por el doble mutante 10tAK1 (Trk⁻, Kup1⁻) por lo que parecen ser capaces de transportar algo de potasio mejorando ligeramente la viabilidad celular durante el crecimiento de la cepa en condiciones de laboratorio. Sin embargo, ninguno de los otros mutantes en los que se inactivó el sistema Kup2 presentó fenotipo alguno asociado a dicha inactivación. Kdp es como ya se ha indicado un sistema de alta afinidad que actúa en la captación de potasio cuando éste se encuentra a muy bajas concentraciones. No resulta por tanto sorprendente que su actividad en las condiciones de crecimiento habituales sea mínima. En nuestros experimentos, utilizamos un medio con bajo contenido de potasio para intentar establecer la posible implicación de este sistema en la respuesta osmoadaptativa de la célula. De nuevo nos encontramos con que la actividad del sistema Trk era suficiente, incluso en estas condiciones, para permitir un crecimiento comparable al de la cepa parental incluso durante la aplicación de un estrés hiperosmótico. Sin embargo, en el mutante 10tAKdp (Trk⁻, Kdp⁻) carente también del sistema Trk, se pudo comprobar que la inactivación del sistema Kdp provocó dificultades en el crecimiento en presencia de NaCl o sacarosa y que estas dificultades no se limitaron al crecimiento en el medio con un bajo contenido de potasio, sino que también se produjeron, aunque fueron menos pronunciadas, en medio mínimo a los distintos pHs ensayados en presencia de NaCl. Es interesante señalar que el mutante 10tAK1 (Trk⁻, Kup1⁻) presentó un mejor crecimiento en el medio con bajo contenido de potasio que el que había presentado en los otros medios utilizados, consecuencia probablemente de la activación del sistema Kdp en estas condiciones. Estos resultados indican que, tal y como se ha descrito en otras bacterias, el sistema Kdp de *S. meliloti* responde a la presencia de bajas concentraciones de potasio en el medio y que además se encuentra implicado en la osmoprotección de la célula incluso en presencia de concentraciones más elevadas de este catión.

En *M. loti* MAFF303099 la captación de potasio en condiciones de laboratorio parece estar mediada mayoritariamente por los sistemas Kup. La viabilidad celular de un mutante en el que se encuentra inactivado el sistema Kup2 es aún lo suficientemente parecida a la de la cepa parental como para poder estudiar la implicación de este sistema en la osmoadaptación celular. Parece que en este mutante el transporte de potasio a través del sistema Kup1 no es suficiente para garantizar la tolerancia a un estrés hiperosmótico ya que el mutante MKup2 (Kup2⁻) presentó una capacidad de crecimiento disminuida respecto a su parental en presencia de NaCl o sacarosa en el medio. Este sistema se encuentra por tanto activo a los distintos pH ensayados e interviene en la osmoprotección de la célula en estas condiciones. Un mutante de *M. loti* en el sistema Kdp sólo presentó problemas de crecimiento ante la adición de NaCl cuando se utilizó un medio con bajas concentraciones de potasio. Estas serían las únicas condiciones aparentemente capaces de activar el sistema Kdp de *M. loti*, lo que se corresponde con lo observado en otras bacterias (Sleator y Hill, 2001).

Todos los mutantes obtenidos en sistemas de transporte de potasio fueron capaces de nodular y fijar nitrógeno. Los mutantes de *M. loti* presentaron un comportamiento similar al de la cepa parental respecto a los distintos parámetros simbióticos estudiados. Es poco probable que el sistema Kdp se encuentre activo en estas condiciones ya que el potasio es un catión abundante que forma sin duda parte de la composición del citosol vegetal. En consecuencia, la captación de potasio se produciría en esta bacteria a través de los sistemas Kup y parece que la actuación del sistema Kup1 sería suficiente para satisfacer las necesidades de potasio de un mutante en el sistema Kup2 durante la simbiosis. Los mutantes de *S. meliloti* que presentaron problemas de crecimiento desarrollaron también una cinética de nodulación retrasada respecto a la cepa parental: 10tAK1 (Trk⁻, Kup1⁻), 10tAK21 (Trk⁻, Kup2⁻, Kup1⁻) y 10tAKK (Trk⁻, Kdp⁻, Kup1⁻). Este retraso no fue debido a la presencia de un menor número de células viables en la solución de cultivo, aunque es posible que las dificultades de estos mutantes para crecer en vida libre afecten a su capacidad para colonizar las raíces durante el establecimiento de la simbiosis. Se emplearon los mutantes simples 10tAG (Trk⁻) y 10K1K (Kup1⁻), en los que se encuentran inactivados los dos sistemas principales de transporte de potasio

de *S. meliloti* 1021, para llevar a cabo un estudio de su eficiencia simbiótica. Estos dos mutantes provocaron la aparición de un mayor número de nódulos en plantas cultivadas en jarras Leonard con vermiculita como sustrato, a pesar de haber presentado una cinética de nodulación semejante a la de su parental en un cultivo hidropónico. Este mayor número de nódulos se relacionó con una capacidad de fijación de nitrógeno por nódulo muy disminuida, de tal modo que la actividad reductora de acetileno por planta tendió a igualarse con la de la cepa parental. En condiciones estresantes la actividad reductora de acetileno en plantas inoculadas con el mutante 10K1K (*Kup1*⁻) aumentó hasta igualarse con la de su parental, lo que puede explicarse por la activación de sistemas *Trk* existentes que se produce en respuesta a estrés osmótico (Sleator y Hill, 2001). Estas condiciones no mejoraron la capacidad de fijación de nitrógeno de un mutante 10tAG (*Trk*⁻), lo que podría indicar que el sistema *Kup1* no se activa en respuesta a estrés osmótico, al menos durante la simbiosis.

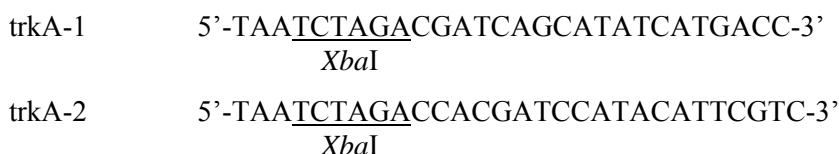
Se puede decir que la situación es en general bastante distinta de la descrita para un mutante de *R. tropici* en un sistema *Kup*, ya que no se observa que la mutación de distintos sistemas de transporte de potasio en otros rizobios tenga un efecto tan importante sobre la interacción simbiótica como el descrito por Nogales y colaboradores (2002). Sin embargo, la gran multiplicidad génica observada en cuanto a la presencia de sistemas de captación de potasio en estas bacterias dificulta en gran medida la asignación de funciones específicas a cada uno de ellos, lo que puede enmascarar su implicación en los procesos estudiados.

Anexos: Capítulo 2

Anexo 2.1. Construcción de mutantes en sistemas de transporte de potasio de *S. meliloti* 1021

Anexo 2.1.1. Construcción de un mutante en el gen *trkA* de *S. meliloti* 1021

Para la construcción de este mutante se amplificó, a partir del ADN genómico de la cepa parental *S. meliloti* 1021, un fragmento de 2.185 pb (Fig. 2.1) que contenía el gen SMc01046, anotado como *trkA*, mediante el uso de los cebadores:



El producto de PCR generado se clonó en pGEM[®]-T Easy dando lugar al plásmido pGEMtA a partir del cual se recuperó el inserto utilizando los sitios *Xba*I incluidos en los cebadores empleados para la amplificación. El fragmento de ADN aislado se clonó en el vector pBSKS(+) y la nueva construcción se denominó pBStA. Posteriormente, un fragmento *Sph*I de 183 pb que se encontraba en la zona central del gen *trkA*, se sustituyó por un cassette de resistencia a Gm que se obtuvo a partir del vector pMS255, digiriendo *Bam*HI. En ambos casos se hicieron extremos romos y se purificaron las bandas correspondientes. La ligación de los dos fragmentos de ADN dio lugar al plásmido pBStAG a partir del cual se recuperó el inserto mediante una digestión *Xba*I. Dicho inserto aislado se clonó en el vector pSUP202Pol4 y la nueva construcción se denominó pStAG. Esta construcción se movilizó hasta la cepa 1021 de *S. meliloti* para obtener el mutante llamado 10tAG. Al tratarse de un vector suicida, el plásmido pStAG no puede replicarse en el fondo genético de *Rhizobium*, propiedad que permite seleccionar transconjugantes en los que se haya producido el correspondiente intercambio alélico ya que serán resistentes a Gm y sensibles a Tc.

En la figura A2.1 se muestra un esquema de la región amplificada y de la mutación resultante. La mutación se verificó en cuatro transconjugantes mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *Eco*RI-*Sma*I utilizando como sonda el fragmento

amplificado de 2.185 pb marcado con digoxigenina (Fig. A2.2A). Como podemos observar en la figura A2.1, la sustitución del fragmento *SphI* (183 pb) por el cassette de Gm (990 pb) provoca un aumento de tamaño del fragmento *EcoRI-SmaI* en el que se encuentra, que pasa de medir aproximadamente 1,9 Kb a medir unas 2,7 Kb. En la hibridación se pueden apreciar marcados, además del fragmento mencionado, los fragmentos adyacentes de 2,5 Kb y 0,9 Kb. El transconjugante 3 presentó una simple integración del plásmido pStAG y en el 2 aparecía también la banda de 1,9 Kb de la copia no mutada del gen. Se llevó a cabo una comprobación adicional con los transconjugantes 1 y 4 amplificando mediante PCR el fragmento para asegurar la ausencia de la copia no mutada del gen. En la figura A2.2B se observa cómo el fragmento amplificado de 2.185 pb de la cepa parental *S. meliloti* 1021 desaparece en ambos transconjugantes y es sustituido por el fragmento mutante de unas 3 Kb.

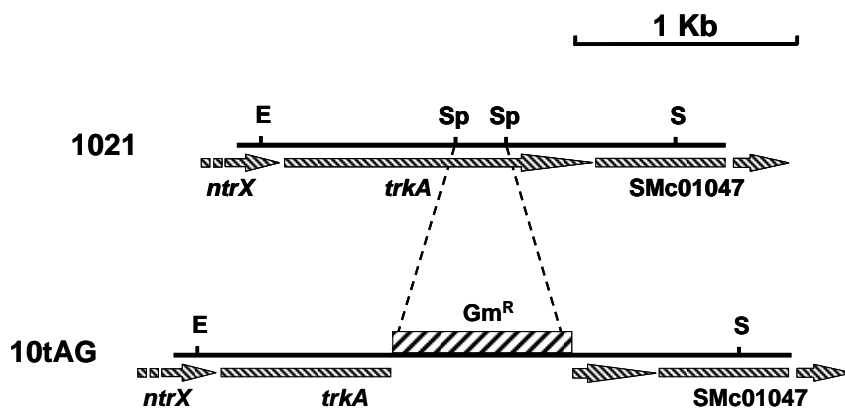


Figura A2.1.- Representación esquemática de la construcción del mutante 10tAG mediante delección e inserción de un cassette de resistencia a Gm.
E: *EcoRI*; **Sp:** *SphI*; **S:** *SmaI*.

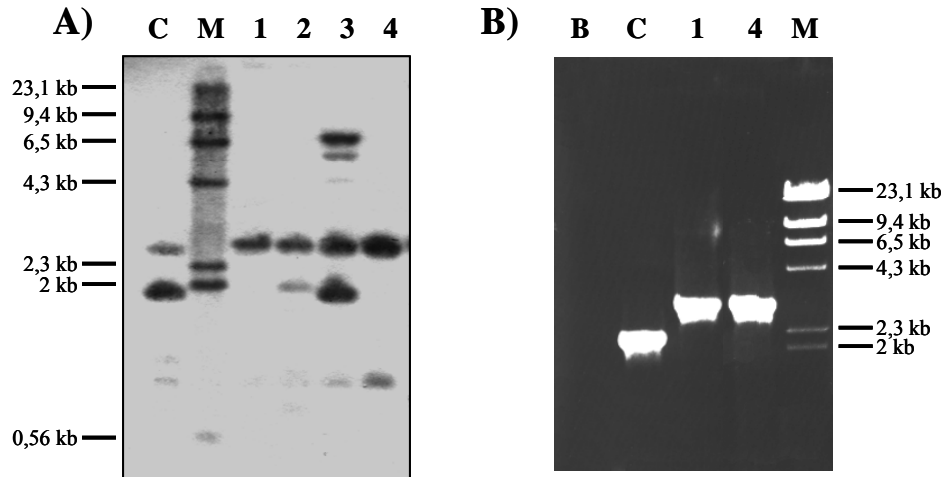


Figura A2.2.- Comprobación de mutantes en el sistema Trk de transporte de potasio de *S. meliloti* 1021.

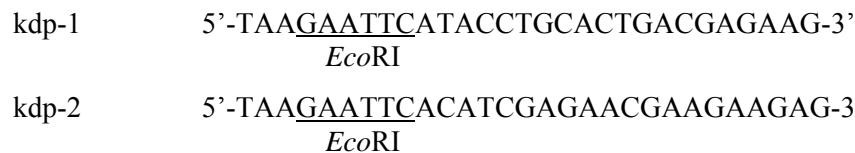
A) Hibridación del ADN genómico digerido con *EcoRI* y *SmaI* frente al amplificado de la región usado como sonda.

B) Amplificado de la región Trk a partir de ADN genómico.

Carriles: C, cepa parental (1021); M, Marcador de peso molecular; 1 y 4, mutantes Trk de *S. meliloti* 1021; 2 y 3, transconjugantes no mutantes.

Anexo 2.1.2. Construcción de un mutante en el operón *kdp* de *S. meliloti* 1021

Para la construcción de este mutante se amplificó, a partir del ADN genómico de la cepa parental *S. meliloti* 1021, un fragmento de 2.938 pb (Fig. R2.3) que contenía la primera parte del operón anotado como *kdp* (SMa0229-SMa233), mediante el uso de los cebadores:



El producto de PCR generado se clonó en pGEM[®]-T Easy dando lugar al plásmido pGKdpA. Posteriormente, un fragmento *XbaI* de 1.084 pb que incluía la primera parte del gen *kdpA*, se sustituyó por un cassette de resistencia a Sm/Spc que se obtuvo a partir del vector pHP45Ω, digiriendo *SmaI* y purificando la banda correspondiente al cassette. De este modo se obtuvo la construcción pGKdpSS que se utilizó para recuperar el inserto mediante una digestión *EcoRI*. El fragmento de ADN aislado se clonó en el

vector pK18*mobsacB* y la nueva construcción se denominó pKKdpSS. Dicha construcción se movilizó hasta la cepa 1021 de *S. meliloti* para obtener el mutante 10KdpSS. Al tratarse de un vector suicida, este plásmido no puede replicarse en el fondo genético de *Rhizobium*, propiedad que permite seleccionar transconjugantes resistentes a Sm/Spc y sensibles a Km, en los que se habrá producido el correspondiente intercambio alélico. El vector pK18*mobsacB* permite una selección adicional basada en la sensibilidad a sacarosa que confiere la presencia del gen *sacB* (Schäfer *et al.*, 1994). Sin embargo, cuando se empleó este vector durante la construcción de algún mutante se evitó utilizar dicha selección en la medida de lo posible ya que, a pesar de precisar concentraciones relativamente bajas de sacarosa, la adición de este osmolito al medio podría interferir en la obtención de mutantes osmosensibles.

En la figura A2.3 se muestra un esquema de la región amplificada y de la mutación resultante en el operón *kdp*. La mutación se verificó en tres transconjugantes mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *SmaI-EcoRV* utilizando como sonda la región amplificada de 2.938 pb marcada con digoxigenina (Fig. A2.4). La sonda hibrida con un fragmento de unas 3,3 Kb del genoma de *S. meliloti* 1021 que en los mutantes pasa a ser de 4,2 Kb por efecto de la delección e inserción del cassette de Sm/Spc.

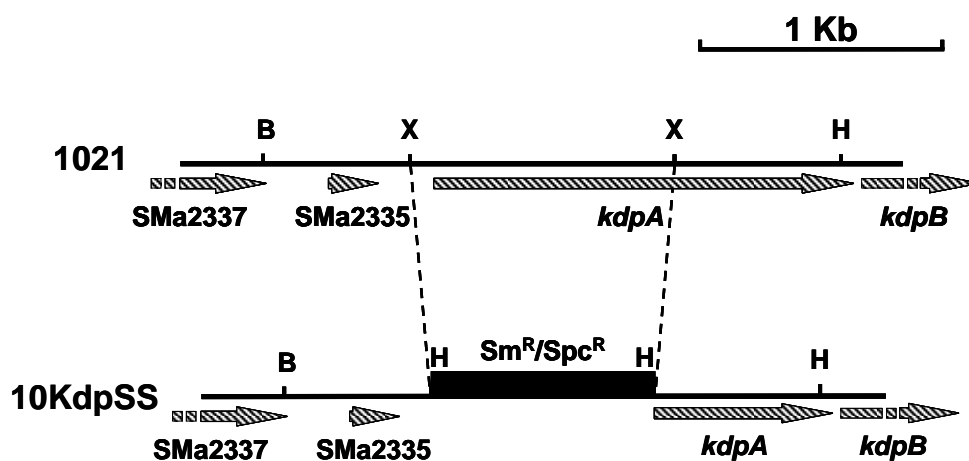


Figura A2.3.- Representación esquemática de la construcción del mutante 10KdpSS mediante delección e inserción de un cassette de resistencia a Sm/Spc.
B: *Bam*HI; **X:** *Xba*I; **H:** *Hind*III

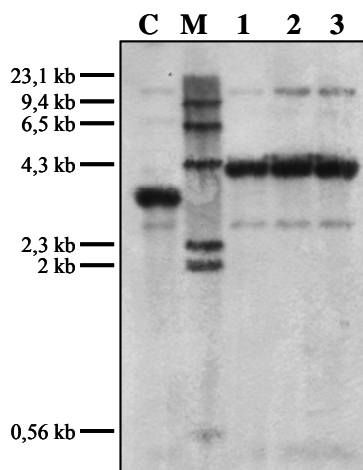
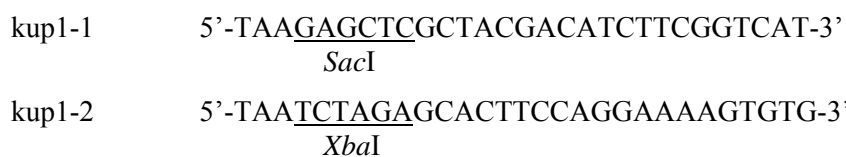


Figura A2.4.- Comprobación de mutantes 10KdpSS de *S. meliloti* mediante hibridación del ADN genómico digerido con *Sma*I y *Eco*RV usando como sonda el amplificado de la región. Carriles: C, cepa parental (1021); M, Marcador de peso molecular marcado con digoxigenina; 1-3, mutantes Kdp' de *S. meliloti* 1021.

Anexo 2.1.3. Construcción de un mutante en el gen *kup1* de *S. meliloti* 1021

Para la construcción de este mutante se amplificó, a partir del ADN genómico de la cepa parental *S. meliloti* 1021, un fragmento de 3.511 pb (Fig. A2.5) que contenía el gen SMc00873 anotado como *kup1*, mediante el uso de los cebadores:



El producto de PCR generado se clonó en el sitio *Sma*I del vector pBSKS(+), dando lugar al plásmido pBSK1-1. A partir de esta construcción se recuperó el inserto como un fragmento *Xba*I-*Sac*I utilizando los sitios incluidos en los cebadores que se emplearon para la amplificación del fragmento. Éste se clonó en pUC18 para obtener el plásmido pUCK1. Posteriormente, se delecionó un fragmento *Eco*RV-*Kpn*I de 411 pb interno al gen *kup1* y se sustituyó por un cassette de Km que se aisló mediante una digestión *Hind*III y se ligó haciendo extremos romos en ambas moléculas. De este modo se obtuvo el plásmido pUCK1K que se utilizó para recuperar el inserto mediante una digestión *Sac*I-*Xba*I. Antes de digerir *Xba*I se generaron extremos romos en el sitio *Sac*I para clonar el fragmento en el vector pK18*mobsacB* digerido *Sma*I-*Xba*I. La

construcción obtenida se denominó pKK1K y se utilizó para la obtención de un mutante en el gen *kup1* mediante intercambio alélico. En este caso, fue imprescindible utilizar la selección basada en la sensibilidad a sacarosa conferida por la presencia del pK18*mobsacB* para la obtención del mutante ya que vector y cassette conferirían resistencia a Km. En consecuencia, una vez obtenido este mutante por el método descrito, la mutación se reconstruyó mediante transducción y se seleccionó por la adquisición directa de la resistencia a Km conferida por el cassette, de modo que no se empleó la sacarosa para la selección del mutante llamado 10K1K.

En la figura A2.5 se muestra un esquema de la región amplificada y de la mutación resultante. La mutación se verificó en cinco colonias procedentes de la transducción, mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *EcoRI* y utilizando como sonda el fragmento amplificado de 3.511 pb marcado con digoxigenina (Fig. A2.6). Esta sonda hibrida con un fragmento *EcoRI* de unas 2 Kb que en los mutantes y por efecto de la deleción e inserción del cassette de Km pasa a ser de aproximadamente 3,8 Kb. La sonda marca también otros dos fragmentos de 6,8 y 2,55 Kb del genoma de *S. meliloti* 1021 que no cambian en los mutantes.

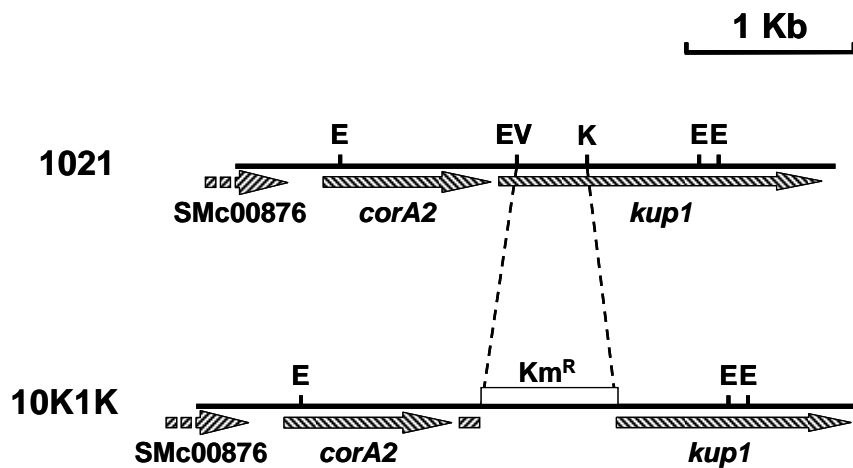


Figura A2.5.- Representación esquemática de la construcción del mutante 10K1K mediante deleción e inserción de un cassette de resistencia a Km.
E: *EcoRI*; **EV:** *EcoRV*; **K:** *KpnI*

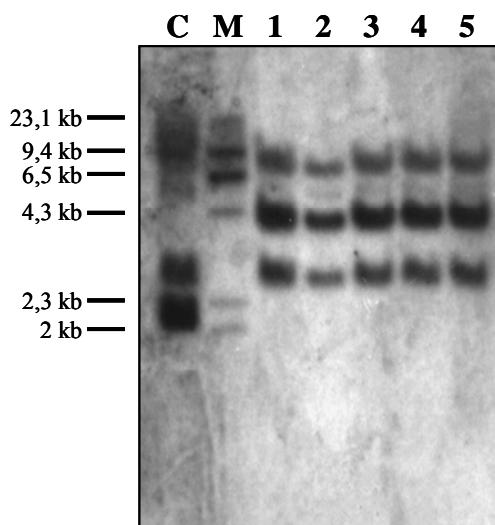
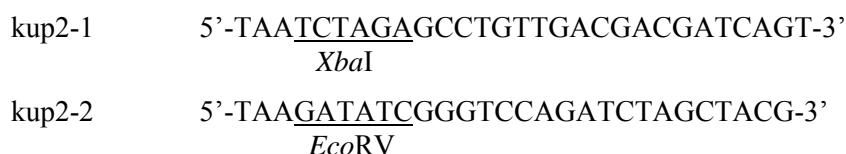


Figura A2.6.- Comprobación de mutantes 10K1K de *S. meliloti* mediante hibridación del ADN genómico digerido con *EcoRI* y usando como sonda el amplificado de la región.

Carriles: C, cepa parental (1021); M, Marcador de peso molecular marcado con digoxigenina; 1-5, mutantes Kup1⁻ de *S. meliloti* 1021.

Anexo 2.1.4. Construcción de un mutante en el gen *kup2* de *S. meliloti* 1021

Para la construcción de este mutante se amplificó, a partir del ADN genómico de la cepa parental *S. meliloti* 1021, un fragmento de 3.363 pb (Fig. A2.7) que contenía el gen anotado como *kup2* (SMA1798), mediante el uso de los cebadores:



El producto de PCR generado se clonó en el sitio *Sma*I del pBSKS(+), dando lugar al plásmido pBSK2-7 en el que la dirección del inserto permitió eliminar la diana *EcoRI* del sitio de clonación múltiple (MCS) del plásmido mediante una delección *EcoRV* utilizando el sitio de corte *EcoRV* incluido en la secuencia del cebador kup2-2. De este modo se obtuvo el plásmido pBSK2E que pudo utilizarse para deleccionar con *EcoRI* una zona de 1.767 pb que contenía el promotor y la mayor parte del gen *kup2*. Este fragmento se sustituyó por un cassette de resistencia a Sm/Spc y la nueva construcción se denominó pBSK2SS. A continuación, se recuperó el inserto mediante una digestión *Xba*I-*EcoRV* utilizando los sitios incluidos en los cebadores empleados durante la

amplificación. Este fragmento se clonó en el vector pK18*mobsacB* digerido *XbaI-SmaI* y el plásmido obtenido se denominó pKK2SS. El plásmido pKK2SS se utilizó para la obtención del mutante 10K2SS. Al tratarse de un vector suicida, este plásmido no puede replicarse en el fondo genético de *Rhizobium*, propiedad que permite seleccionar transconjugantes resistentes a Sm/Spc y sensibles a Km, en los que se habrá producido el correspondiente intercambio alélico. Tal y como se explica en el anexo 2.1.2, se evitó utilizar la selección basada en la sensibilidad a sacarosa que permite el vector pK18*mobsacB* durante la obtención del mutante.

En la figura A2.7 se muestra un esquema de la región amplificada y de la mutación resultante en el gen *kup2* de *S. meliloti*. La mutación se verificó en seis transconjugantes, mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *BamHI* utilizando como sonda el fragmento amplificado de 3.363 pb marcado con digoxigenina (Fig. A2.8). Esta sonda hibrida con un fragmento de unas 10,8 Kb del genoma de *S. meliloti* 1021 que en los mutantes y por efecto de la inserción del cassette se divide en dos fragmentos de 8 Kb y 1 Kb respectivamente. También aparece marcado de manera inespecífica un fragmento de unas 3 Kb presente en todas las cepas.

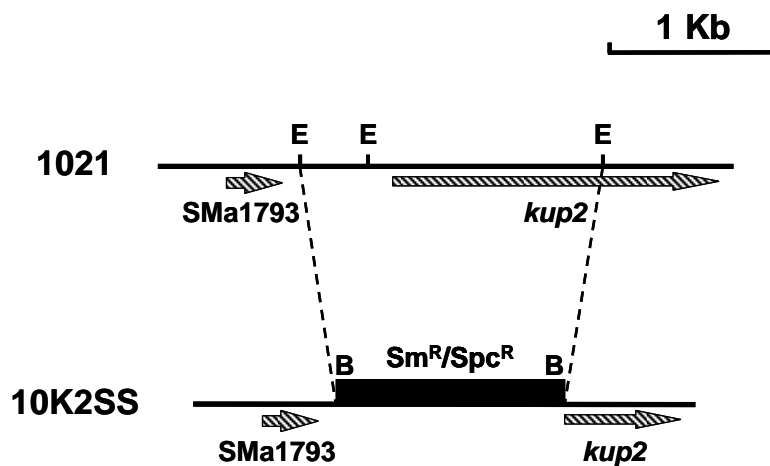


Figura A2.7.- Representación esquemática de la construcción del mutante 10K2SS mediante delección e integración de un cassette de resistencia a Sm/Spc. **E:** *EcoRI*; **B:** *BamHI*

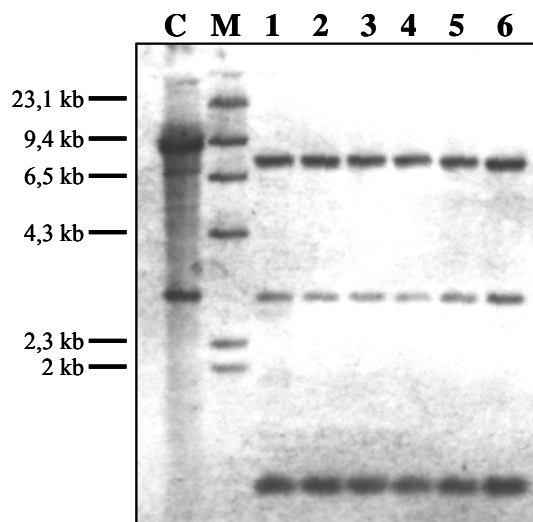


Figura A2.8.- Comprobación de mutantes 10K2SS de *S. meliloti* mediante hibridación del ADN genómico digerido con *Bam*HI y usando como sonda el amplificado de la región.

Carriles: C, cepa parental (1021); M, Marcador de peso molecular marcado con digoxigenina; 1-6, mutantes Kup2⁻ de *S. meliloti* 1021.

Anexo 2.1.5. Construcción de los mutantes dobles y triples en sistemas de transporte de potasio de *S. meliloti* 1021

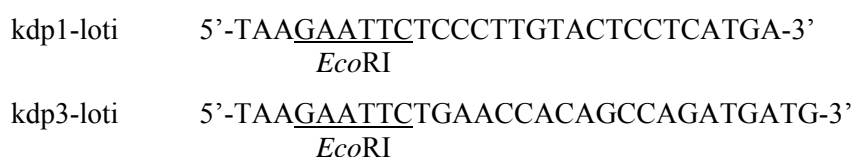
El mutante doble 10K1K2 (Kup1⁻, Kup2⁻) se obtuvo mediante transducción utilizando el mutante 10K2SS (Kup2⁻) como receptor y el mutante 10K1K (Kup1⁻) como donador y seleccionando la adquisición de la resistencia a Km. Los mutantes dobles 10tAK1 (TrkA⁻, Kup1⁻), 10tAK2 (TrkA⁻, Kup2⁻) y 10tAKdp (TrkA⁻, Kdp⁻) se obtuvieron también mediante transducción. Se utilizó el mutante 10tAG (TrkA⁻) como receptor y, según el caso, se empleó como donador el mutante 10K1K (Kup1⁻), el 10K2SS (Kup2⁻) o el 10KdpSS (Kdp⁻). Los nuevos mutantes se seleccionaron por la adquisición de la resistencia a Km en el caso de 10tAK1 (TrkA⁻, Kup1⁻) y a Sm/Spc en el caso de los mutantes 10tAK2 (TrkA⁻, Kup2⁻) y 10tAKdp (TrkA⁻, Kdp⁻). Para la construcción de los triples mutantes 10tAK21 (TrkA⁻, Kup2⁻, Kup1⁻) y 10tAKK (TrkA⁻, Kdp⁻, Kup1⁻) se utilizó como donador el mutante 10K1K (Kup1⁻) y como receptores los mutantes 10tAK2 (TrkA⁻, Kup2⁻) y 10tAKdp (TrkA⁻, Kdp⁻), respectivamente. En ambos casos se seleccionaron los mutantes por la adquisición de la resistencia a Km.

De todos los mutantes descritos se comprobaron al menos cuatro colonias mediante hibridación, tal y como se describe para la construcción de los mutantes simples que se utilizaron como donadores.

Anexo 2.2. Construcción de mutantes en sistemas de transporte de potasio de *M. loti* MAFF303099

Anexo 2.2.1. Construcción de un mutante en el operón *kdp* de *M. loti* MAFF303099

Para la construcción de este mutante se amplificó, a partir del ADN genómico de la cepa parental *M. loti* MAFF303099, un fragmento de 2.964 pb (Fig. A2.9) que contenía la primera parte del operón anotado como *kdp* (mll3129-mll3133) en el genoma de esta bacteria, mediante el uso de los siguientes cebadores:



El producto de PCR generado se clonó en pGEM[®]-T Easy dando lugar al plásmido pGIKdp-3. Posteriormente, se delecionó un fragmento *ClaI-XhoI* de 734 pb interno al gen *kdpA* y se sustituyó por un cassette de resistencia a Tc que se obtuvo mediante una digestión *SmaI* a partir del vector pHP45Ω-Tc. A continuación se aisló el inserto de la construcción resultante, denominada pGIKdpT, utilizando los sitios *EcoRI* incluidos en los cebadores. El fragmento de ADN aislado se clonó en el vector pK18*mobsacB* y la nueva construcción se denominó pKIKdpT. Este plásmido se movilizó hasta la cepa MAFF303099 de *M. loti* para obtener el mutante llamado MKdpT. Al tratarse de un vector suicida, incapaz de replicarse en el fondo genético de *Rhizobium*, se pudieron seleccionar transconjugantes en los que se había producido el intercambio alélico por ser éstos resistentes a Tc y sensibles a Km.

En la figura A2.9 se muestra de modo esquemático la región amplificada y la mutación resultante. La mutación se verificó en cinco transconjugantes, mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *EcoRI* y *BamHI* utilizando como sonda el fragmento amplificado de 2.964 pb marcado con digoxigenina (Fig. A2.10). Esta sonda hibrida con un fragmento de unas 5,5 Kb del genoma de *M. loti* MAFF303099 que por efecto de la inserción del cassette desaparece y es sustituido por dos de 3,2 Kb y

1,6 Kb aproximadamente. En la figura se puede apreciar que en este caso sólo los transconjugantes 1, 2 y 4 resultaron ser portadores de la mutación.

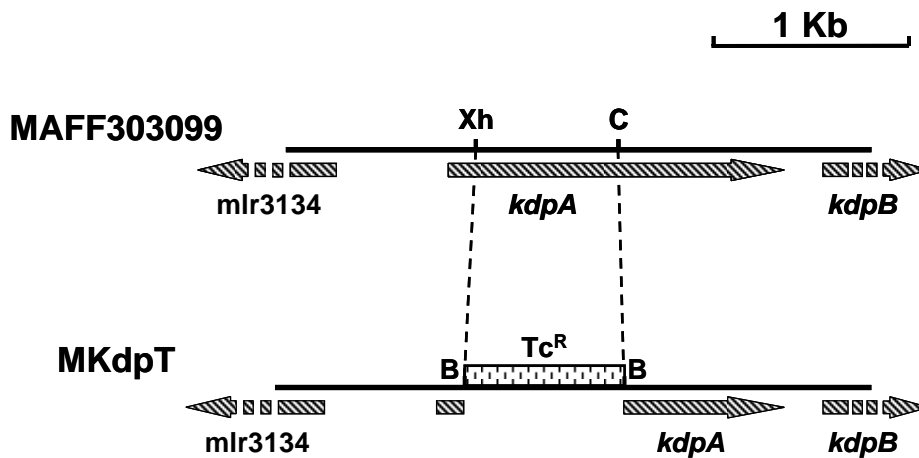


Figura A2.9.- Representación esquemática de la construcción del mutante MKdpT mediante delección e inserción de un cassette de resistencia a Tc.
Xh: *Xho*I; **C:** *Cla*I; **B:** *Bam*HI

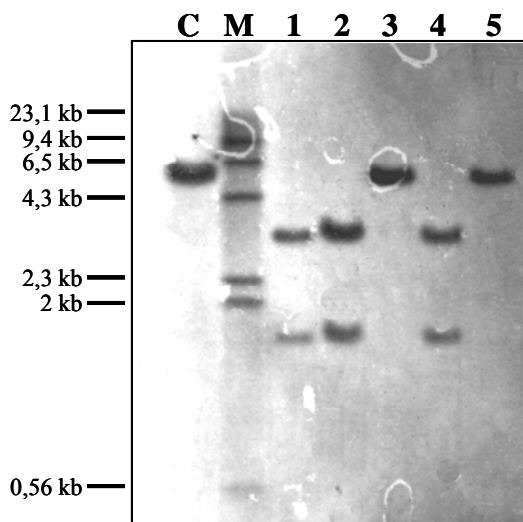


Figura A2.10.- Comprobación de mutantes MKdpT de *M. loti* mediante hibridación del ADN genómico digerido con *Eco*RI y *Bam*HI y utilizando como sonda el amplificado de la región correspondiente.
 Carriles: C, cepa parental (MAFF303099); M, Marcador de peso molecular marcado con digoxigenina; 1, 2 y 4, mutantes Kdp^- de *M. loti* MAFF303099; 3 y 5, transconjugantes no mutantes.

Anexo 2.2.2. Construcción de un mutante en el gen *kup2* de *M. loti* MAFF303099

Para la construcción de este mutante se amplificó, a partir del ADN genómico de la cepa parental *M. loti* MAFF303099, un fragmento de 4.238 pb (Fig. A2.11) que contenía los genes *mll1417* y *mll1416*, ambos anotados como *kup*. Para la amplificación se utilizaron los siguientes cebadores:

kup1-loti 5'-TAACCCGGGCCCTATCTGTTCCCATCAAAG-3'
 kup2-loti 5'-TAACCCGGGACCGTCGTCACCAGCATGTT-3'

El producto de PCR generado se clonó en pGEM[®]-T Easy dando lugar al plásmido pGIKup. Posteriormente, se aisló un fragmento del extremo del inserto utilizando el sitio *EcoRI* del vector y un sitio *EcoRV* presente en el amplificado. Dicho fragmento, de 992 pb, contenía una región interna al gen *kup2* que se clonó en el vector pSUP202Pol4 digerido *SmaI-EcoRI*, dando lugar al plásmido pSIKup-1Kb. Este plásmido se utilizó para la obtención del mutante MKup2 mediante simple integración de la construcción completa en el gen *kup2* de *M. loti* MAFF303099, seleccionando para ello transconjugantes resistentes a Tc. En la figura A2.11 se muestra un esquema de la región amplificada y de la mutación resultante. La mutación se verificó en seis transconjugantes mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *EcoRI* y utilizando como sonda el fragmento amplificado de 4.238 pb marcado con digoxigenina (Fig. A2.12). Dicha sonda hibrida con un fragmento de unas 2,3 Kb en el genoma de la cepa parental MAFF303099 que en los mutantes es sustituido por dos fragmentos de 1,2 Kb y 8,7 Kb. También aparecen marcados dos fragmentos de 2,6 Kb y 0,7 Kb que se encuentran tanto en la cepa parental como en los mutantes. En la figura A2.12 se observa que cuatro de los seis transconjugantes eran portadores de la mutación.

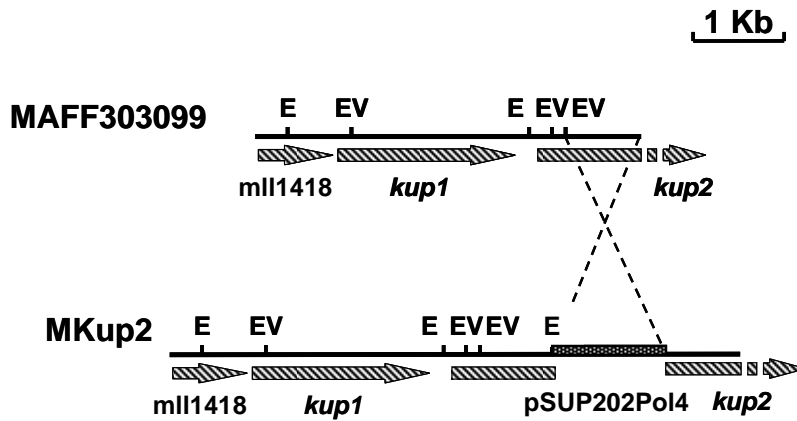


Figura A2.11.- Representación esquemática de la construcción del mutante MKup2 mediante integración del vector pSUP202Pol4.
E: *EcoRI*; EV: *EcoRV*

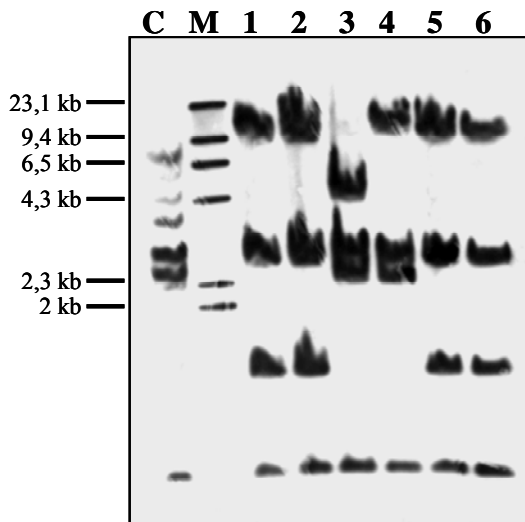


Figura A2.12- Comprobación de mutantes MKup2 de *M. loti* mediante hibridación del ADN genómico digerido con *EcoRI* y utilizando como sonda el amplificado de la región correspondiente.
Carriles: C, MAFF303099 (cepa parental); M, Marcador de peso molecular marcado con digoxigenina; 1, 2, 5 y 6, mutantes Kup2⁻ de *M. loti* MAFF303099; 3 y 4, transconjugantes no mutantes.

Resultados: Capítulo 3

3. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE SISTEMAS DE SÍNTESIS DE TREHALOSA EN *Sinorhizobium meliloti* Y *Mesorhizobium loti*

La trehalosa es un disacárido (α -D-glucopiranosil α -D-glucopiranosido), reconocido como un eficiente osmoprotector en diversos organismos (Argüelles, 2000). Cuando se encuentra presente en el medio extracelular, los organismos expuestos a diversos estreses pueden importar y acumular esta trehalosa, o bien importarla y metabolizarla, teniendo en este último caso un carácter de osmoprotector no acumulado, como ocurre en *S. meliloti* (Gouffi *et al.*, 1999). La trehalosa también puede ser sintetizada endógenamente por numerosos organismos y acumulada como respuesta a determinadas condiciones ambientales o la fase de crecimiento en la que se encuentra.

Se sabe que algunas especies de rizobios, como *S. meliloti*, sintetizan y acumulan trehalosa durante su entrada en la fase estacionaria de crecimiento y se cree que dicha trehalosa puede proporcionarles protección ante la exposición a un estrés hiperosmótico. Además, los rizobios también acumulan trehalosa en respuesta a otras condiciones ambientales como la disminución de la tensión de oxígeno en el medio (Streeter, 1987; Hoelzle y Streeter, 1990; Breedveld *et al.*, 1990; Müller *et al.*, 1994).

En el estudio del transcriptoma de *S. meliloti* en respuesta a choque osmótico, cuyos resultados se presentan en el capítulo 1, se puede observar que la mayoría de los genes que se encuentran inducidos tienen funciones desconocidas o hipotéticas. Sin embargo, aparecen sobreexpresados hasta tres genes relacionados con distintas rutas de síntesis de trehalosa.

Hasta el momento sólo se ha descrito la obtención de un mutante de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii incapaz de sintetizar trehalosa (McIntyre *et al.*, 2007) y en ningún caso se ha determinado la función de este compuesto durante la adaptación a estrés osmótico. La falta de disponibilidad de este tipo de mutantes se debe, probablemente, a que los rizobios suelen poseer múltiples rutas para la biosíntesis de trehalosa (Galibert *et al.*, 2001; Streeter y Gómez, 2006).

Para un estudio más completo de la importancia de la síntesis y acumulación de trehalosa por *Rhizobium* en su adaptación a estrés hiperosmótico y el establecimiento de simbiosis fijadoras de nitrógeno, hemos elegido el estudio de dos simbiosis, la establecida entre *S. meliloti* y *Medicago sativa* y la formada por *M. loti* y *Lotus tenuis*, tal y como ya se hizo en el capítulo anterior para la caracterización de mutantes en los sistemas de transporte de potasio.

3.1 Caracterización de genes implicados en la síntesis de trehalosa en *S. meliloti* y *M. loti*

En el genoma de *S. meliloti* 1021 aparece anotado un gen *otsA* (SMa0233), localizado en el plásmido simbiótico pSymA (Galibert *et al.*, 2001). El producto de dicho gen es una proteína de 463 aminoácidos que presenta una elevada homología con otras trehalosa-6-fosfato sintasas anotadas en diversos rizobios (Tabla R3.1) y tiene un 44% de identidad con la trehalosa-6-fosfato sintasa de *Escherichia coli*.

Tabla R3.1.- Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *otsA* (SMa0322) de *S. meliloti* 1021 y las de otros rizobios.

Organismo	Gen	Identidad
<i>S. medicae</i> WSM419	Smed_5911	94%
<i>Rhizobium</i> sp NGR234	NGR234_290	91%
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_CH00476	79%
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_PA00087	50%
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	RL0503	78%
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> NZP561	<i>otsA</i>	78%
<i>Mesorhizobium</i> sp. BCN1	Meso_1527	48%
<i>M. loti</i> MAFF303099	mlr9595	48%
<i>M. loti</i> MAFF303099	mll0691	33%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	BRADO6952	47%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_0578	46%
<i>B. japonicum</i> USDA110	bll0322	46%

El gen de *M. loti* MAFF303099 que presenta mayor homología con el gen anotado como *otsA* en *S. meliloti* es el mlr9595 (48% de identidad). Este gen se encuentra anotado como una trehalosa-6-fosfato sintasa en *M. loti* (Kaneko *et al.*, 2000). Sin embargo, codifica una proteína de sólo 275 aminoácidos y su homología se limita a la región 3' de otros genes *otsA*. Además, el gen inmediatamente aguas arriba (msr9761), que está anotado como semejante a una trehalosa-6-fosfato sintasa codifica una proteína de 130 aminoácidos y presenta un 37% de identidad con la región 5' del gen *otsA* de *S. meliloti*. En consecuencia, es probable que ambos ORFs formen conjuntamente una copia truncada de *otsA* presente en el genoma de *M. loti* MAFF303099.

Por otra parte, podemos encontrar en *M. loti* un operón constituido por los ORFs mll0690 y mll0691, anotados como trehalosa-6-fosfato fosfatasas (Kaneko *et al.*, 2000). Se trata probablemente de un operón *otsBA* mal anotado, ya que mll0691 codifica una proteína de 520 aminoácidos que presenta su mayor homología entre los rizobios con otras trehalosa-6-fosfato sintasas (Tabla R3.2) y tiene un 32% de identidad con la proteína OtsA de *E. coli*.

Tabla R3.2.- Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *otsA2* (mll0691) de *M. loti* MAFF303099 y las de otros rizobios.

Organismo	Gen	Identidad
<i>M. loti</i> MAFF303099	mlr9595	35%
<i>Mesorhizobium</i> sp. BCN1	Meso_1527	34%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	BRADO6952	34%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_0578	34%
<i>B. japonicum</i> USDA110	bll0322	32%
<i>S. meliloti</i> 1021	SMa0233	33%
<i>R. leguminosarum</i> bv. viciae 3841	RL0503	33%
<i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii NZP561	<i>otsA</i>	32%
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_CH00476	32%
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_PA00087	31%
<i>Rhizobium</i> sp NGR234	NGR234_290	31%

Para evitar confusión, llamaremos *otsA1* al gen mlr9595 y *otsA2* al mll0691. Curiosamente, el gen *otsA2* de *M. loti* presenta porcentajes de identidad mayores con organismos alejados filogenéticamente, por ejemplo con δ -proteobacterias como *Pelobacter propionicus* (60%), *Geobacter lovleyi* (59%) o *Anaeromyxobacter dehalogenans* (59%), con Firmicutes como *Moorella thermoacetica* (41%) o incluso con alguna arquea como *Haloarcula morismortui* (40%), que con otros rizobios (31-35%). Este hecho, junto con la presencia de otra copia de *otsA* en el genoma de dicha bacteria sugiere una posible adquisición del operón *otsBA* de *M. loti* por transferencia genética horizontal.

Tabla R3.3.- Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *otsB* (mll0690) de *M. loti* MAFF303099 y las de otros rizobios.

Organismo	Gen	Identidad
<i>Rhizobium</i> sp NGR234	NGR234_289	43%
<i>S. medicae</i> WSM419	Smed_5910	42%
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_PC00228	37%
<i>R. leguminosarum</i> bv. viciae 3841	pRL100466	37%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	BRADO6953	35%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_0577	34%
<i>B. japonicum</i> USDA110	bll0323	34%
<i>Mesorhizobium</i> sp. BCN1	Meso_1529	34%

El gen mll0690, anotado como *otsB* en *M. loti*, presenta sus mayores homologías con otros genes *otsB* de diversos rizobios (Tabla R3.3) y tiene un 39% de identidad con el gen *otsB* de *E. coli*. Sin embargo, no pudo encontrarse ningún gen con una homología significativa con *otsB* en el genoma de *S. meliloti* 1021.

El análisis de la secuencia del genoma de *M. loti* no revela la presencia de ningún otro gen con homología a sistemas conocidos de síntesis de trehalosa. Sin embargo, en *S. meliloti* 1021 el gen SMb20574 se encuentra anotado como “posible maltooligosil trehalosa sintasa”. Este gen se localiza en el plásmido pSymB y codifica una proteína de 875 aminoácidos con homología a maltooligosil trehalosa sintasas de distintos rizobios (Tabla R3.4) y con un 32-34% de identidad con esta enzima en *Mycobacterium tuberculosis*, *M. smegmatis* y *Corynebacterium glutamicum*.

Tabla R3.4.- Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *treY* (SMb20574) de *S. meliloti* 1021 y las de otros rizobios.

Organismo	Gen	Identidad
<i>S. medicae</i> WSM419	Smed_4211	82%
<i>Rhizobium</i> sp NGR234	RNGR00106	65%
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	pRL11011	48%
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> NZP561	<i>treY</i>	47%
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_PE00008	47%
<i>Mesorhizobium</i> sp. BNC1	Meso_2673	41%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	BRADO5820	37%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_6326	36%
<i>B. japonicum</i> USDA110	blr6771	36%

Hay que señalar que varios de estos ORFs no se encuentran anotados como *treY* a pesar de presentar sus mayores homologías con este gen. Por ejemplo, el ORF pRL11011 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* aparece erróneamente anotado como una “posible trehalosa sintasa” mientras que los correspondientes genes de las distintas especies de *Bradyrhizobium* están anotados como “probables glicosil hidrolasas”. En el caso de los dos *Bradyrhizobium* sp. dichas “probables glicosil hidrolasas” se encuentran formando sendos operones con genes anotados como maltooligosil trehalosa trehalohidrolasas (*treZ*).

En el genoma de *S. meliloti* 1021 no aparece ningún gen *treZ* anotado. Sin embargo, el gen SMb21447, que se encuentra en el plásmido pSymB anotado como *glgB2*, tiene un homólogo en *S. medicae* con un 83% de identidad anotado como *treZ* y presenta los mayores porcentajes de identidad con otros genes *treZ* de diversas bacterias como el de *Rhodobacter sphaeroides* (50%) o el de *Rubrobacter xylanophilus* (48%). Entre los rizobios resulta ser homólogo a genes que también son probablemente *treZ* (Tabla R3.5). Por ejemplo, en el caso de las dos *Bradyrhizobium* sp. la mayor homología se obtiene con los correspondientes genes anotados como *treZ*. En *B. japonicum*, con el gen que se encuentra aguas abajo del posible *treY* que hemos descrito y que además presenta un 37% de identidad con el gen *treZ* de *Arthrobacter* sp. Q36. En *R. etli* y *R. leguminosarum* bv. *viciae* sus homólogos son genes con identidades de más del 40% con el *treZ* de *Arthrobacter ramosus* y de *Rhizobium* sp. M11 respectivamente. La anotación en *R. etli* es incorrecta, probablemente porque refleja el error en *S. meliloti*.

Tabla R3.5.- Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *glgB2* (SMb21447) de *S. meliloti* 1021 y las de otros rizobios.

Organismo	Gen	Identidad
<i>S. medicae</i> WSM419	Smed_4408	83%
<i>Mesorhizobium</i> sp. BCN1	Meso_2675	47%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	BRADO5819	46%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_6325	46%
<i>B. japonicum</i> USDA110	blr6770	46%
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	pRL20722	46%
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_PF00263	45%

Aunque en ambos casos estos genes codifican enzimas que catalizan la hidrólisis de un enlace glucosídico $\alpha(1, 4)$, el gen *glgB* se encuentra bastante conservado entre distintas bacterias y el ORF SMc03922, anotado en *S. meliloti* como *glgB1*, presenta un 53% de identidad con el *glgB* de *E. coli*. Dada su homología con genes *treZ* y su falta de homología con genes *glgB*, es probable que *glgB2* esté mal anotado en el genoma de *S. meliloti* 1021.

Por último, el análisis del genoma de *S. meliloti* revela también la presencia del gen SMB20099 localizado en el plásmido pSymb, que codifica una posible trehalosa sintasa. Dicho gen presenta una elevada homología con el gen *treS* de distintas bacterias como *M. tuberculosis* o *C. glutamicum* (Wolf *et al.*, 2003). Entre los rizobios aparecen numerosos genes homólogos a éste, todos ellos anotados como trehalosa sintasas (Tabla R3.6).

Tabla R3.6.- Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen *treS* (SMB20099) de *S. meliloti* 1021 y las de otros rizobios.

Organismo	Gen	Identidad
<i>S. medicae</i> WSM419	Smed_4038	88%
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_CH02260	44%
<i>R. etli</i> CFN42	RHE_PF00276	40%
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	pRL120709	40%
<i>Mesorhizobium</i> sp. BCN1	Meso_3683	46%
<i>Mesorhizobium</i> sp. BCN1	Meso_2678	40%
<i>B. japonicum</i> USDA110	bll0902	42%
<i>B. japonicum</i> USDA110	blr6767	38%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	BRADO0512	42%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	BRADO5816	38%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	BBta_6322	38%

En los *Bradyrhizobium* y en *Mesorhizobium* sp. BCN1 una copia de este gen se encuentra formando un operón con *glgB*, *glgX*, *treZ* y *treY* entre otros. La ramificación del glucógeno catalizada por la enzima que codifica *glgB* puede promover la producción de trehalosa aumentando el número de extremos libres en la cadena sobre los que la maltooligosil trehalosa sintasa puede actuar. Además, durante la degradación del glucógeno se puede producir maltosa que daría lugar a trehalosa mediante la trehalosa sintasa. La expresión conjunta de estos genes puede implicar su actuación coordinada que conduciría a una activación de la síntesis de trehalosa a partir de glucógeno en estas bacterias.

Con estos antecedentes, se planteó la construcción de mutantes de *S. meliloti* 1021 y *M. loti* MAFF303099 en cada una de las posibles rutas de biosíntesis de trehalosa descritas, así como de mutantes en los que se inactiven simultáneamente varias rutas. La obtención de los distintos mutantes se describe en los anexos 3.1 y 3.2.

3.2 Capacidad de osmoadaptación en vida libre de mutantes en rutas de síntesis de trehalosa de *S. meliloti*

3.2.1. Crecimiento de los mutantes de *S. meliloti* 1021 en medio líquido

Para la determinación de la capacidad de osmoadaptación de los mutantes obtenidos en sistemas de síntesis de trehalosa, se llevaron a cabo curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 300 mM NaCl (Fig. R3.2), 400 mM NaCl (Fig. R3.3), 500 mM NaCl (Fig. R3.4), 500 mM sacarosa (Fig. R3.5) y 700 mM sacarosa (Fig. R3.6). Cada tubo se inoculó con 10^6 - 10^7 ufc de la cepa de interés y el crecimiento se estableció como una función de la D.O._{600nm} medida a lo largo de 100-150 horas. En todos los casos se incluyó la cepa parental (*S. meliloti* 1021) como referencia y se llevó a cabo simultáneamente una curva de crecimiento en medio mínimo como control (Fig. R3.1).

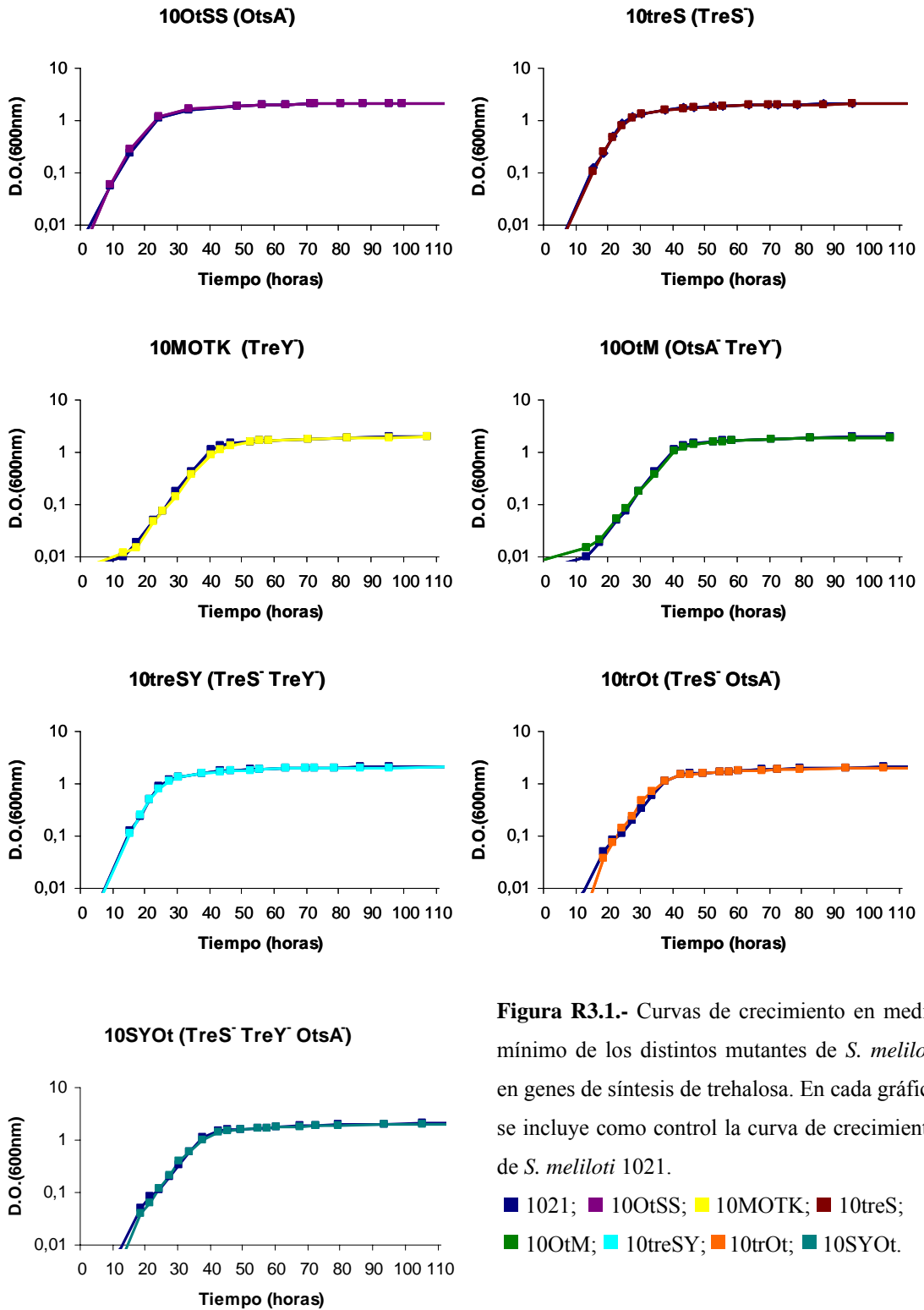


Figura R3.1.- Curvas de crecimiento en medio mínimo de los distintos mutantes de *S. meliloti* en genes de síntesis de trehalosa. En cada gráfica se incluye como control la curva de crecimiento de *S. meliloti* 1021.

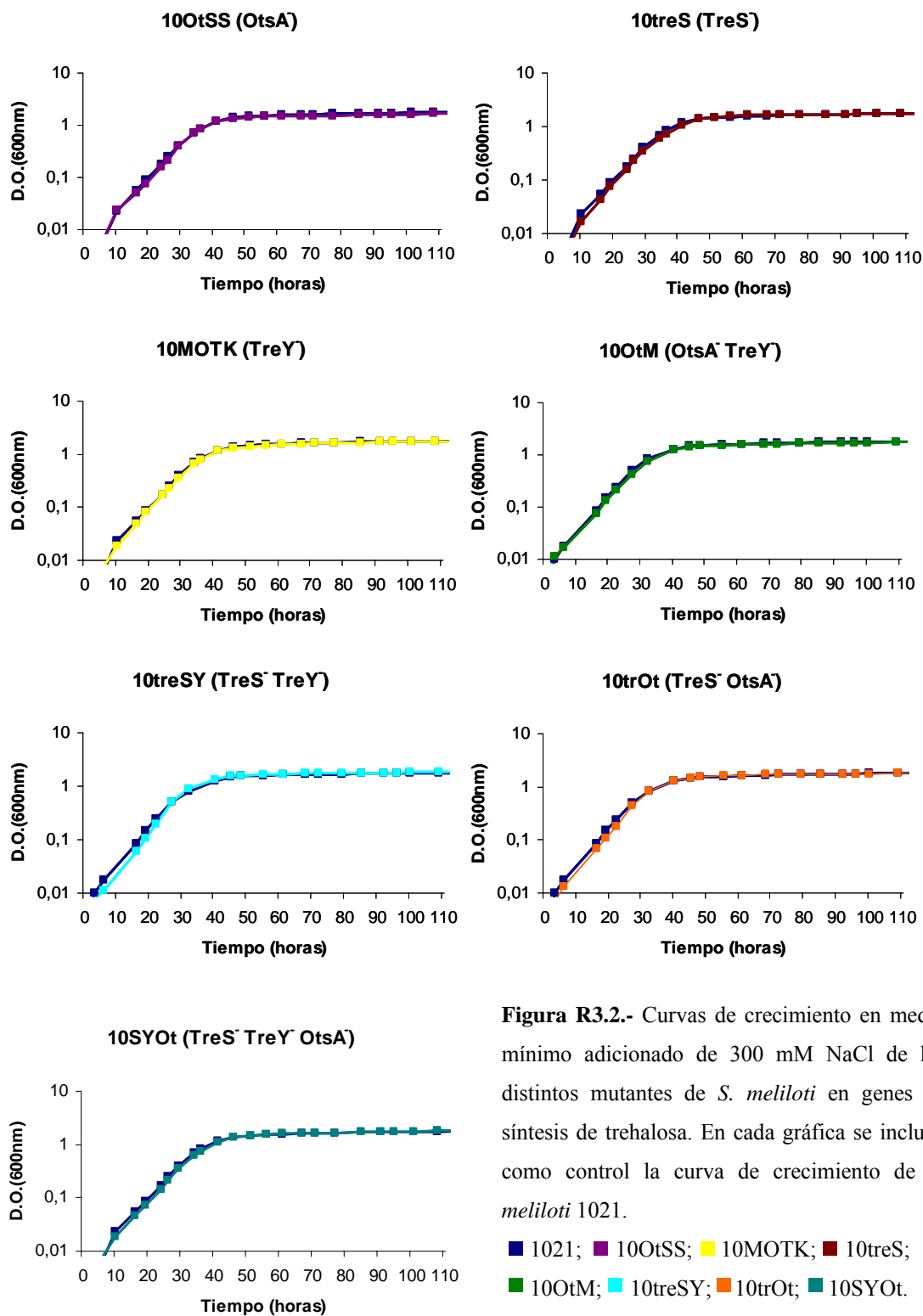


Figura R3.2.- Curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 300 mM NaCl de los distintos mutantes de *S. meliloti* en genes de síntesis de trehalosa. En cada gráfica se incluye como control la curva de crecimiento de *S. meliloti* 1021.

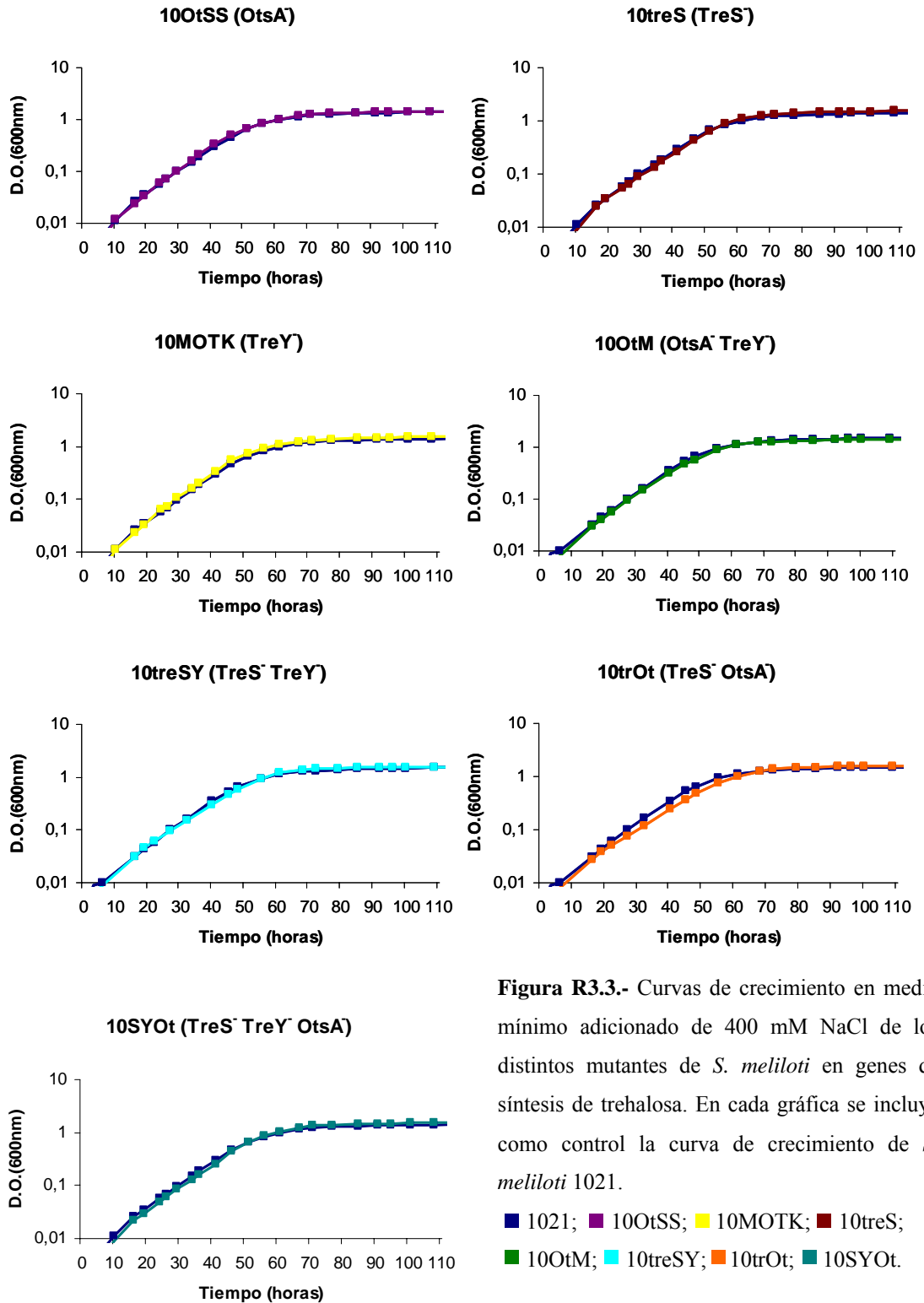


Figura R3.3.- Curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 400 mM NaCl de los distintos mutantes de *S. meliloti* en genes de síntesis de trehalosa. En cada gráfica se incluye como control la curva de crecimiento de *S. meliloti* 1021.

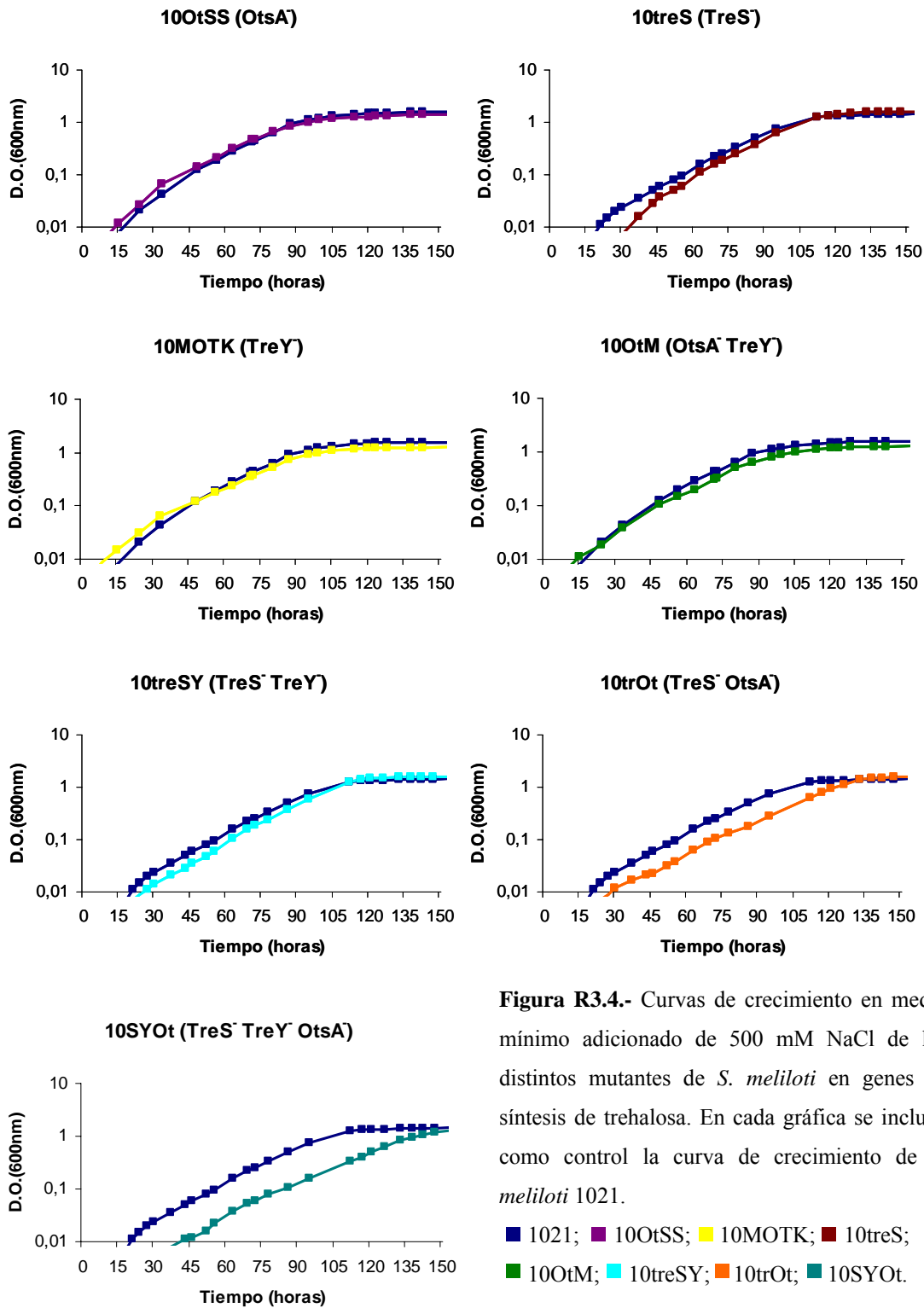


Figura R3.4.- Curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 500 mM NaCl de los distintos mutantes de *S. meliloti* en genes de síntesis de trehalosa. En cada gráfica se incluye como control la curva de crecimiento de *S. meliloti* 1021.

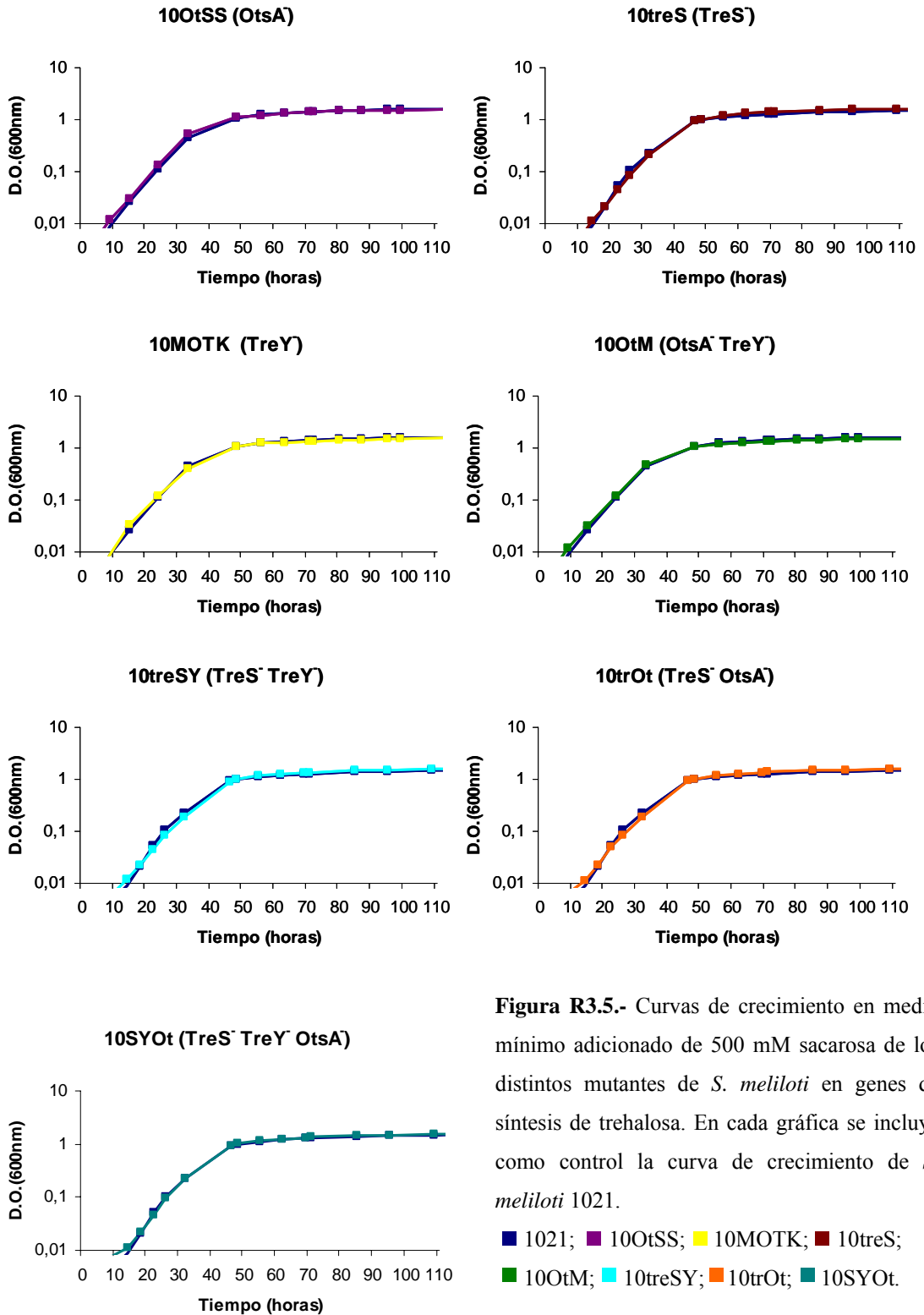


Figura R3.5.- Curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 500 mM sacarosa de los distintos mutantes de *S. meliloti* en genes de síntesis de trehalosa. En cada gráfica se incluye como control la curva de crecimiento de *S. meliloti* 1021.

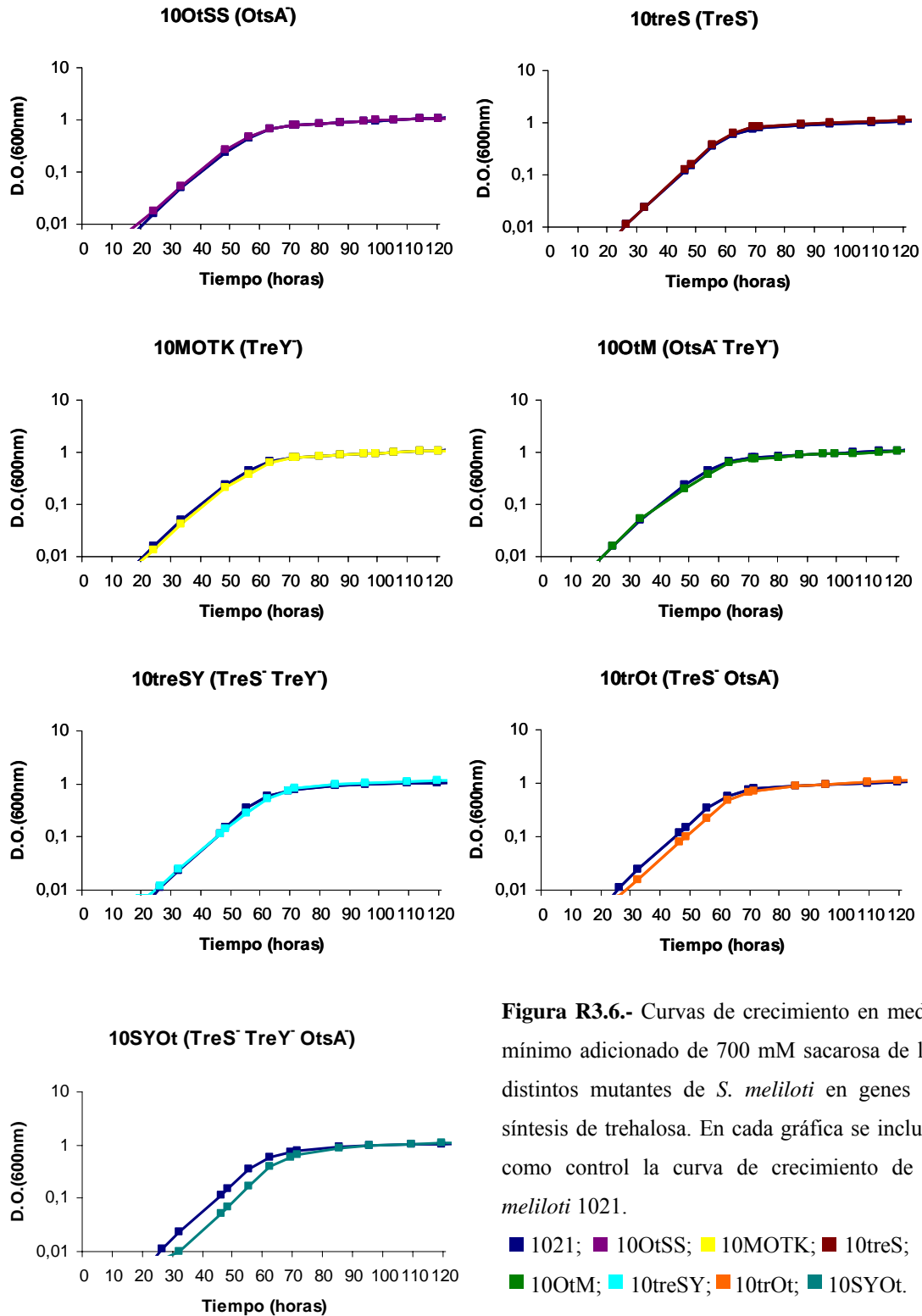


Figura R3.6.- Curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 700 mM sacarosa de los distintos mutantes de *S. meliloti* en genes de síntesis de trehalosa. En cada gráfica se incluye como control la curva de crecimiento de *S. meliloti* 1021.

Todos los mutantes presentaron una capacidad de crecimiento en medio mínimo semejante a la de la cepa parental (Fig. R3.1). Los mutantes simples mostraron además un crecimiento comparable al de la cepa parental en todas las condiciones ensayadas (Fig. R3.2, R3.3, R3.4, R3.5 y R3.6). Entre los mutantes dobles, sólo 10trOt (TreS⁻, OtsA⁻) presentó un retraso en su crecimiento respecto a la cepa parental en condiciones de osmolaridad muy elevada provocada por altas concentraciones de NaCl (Fig. R3.4) y, en menor medida, de sacarosa (Fig. R3.6). A pesar de no ser un fenotipo muy acusado, se repitió de modo consistente. Algo semejante se observó en las curvas de crecimiento del triple mutante 10SYOt (TreS⁻, TreY⁻, OtsA⁻), si bien el retraso fue más evidente que para el doble mutante (Fig. R3.4 y R3.6). Es interesante subrayar que en ambos casos la adición de NaCl o sacarosa al cultivo sólo produjo un efecto cuando se utilizaron concentraciones muy elevadas del soluto y que a concentraciones más bajas, el crecimiento de los mutantes fue indistinguible del de la cepa parental (Fig. R3.2, R3.3 y R3.5), lo que indicaba una respuesta dependiente de dosis.

Además de las curvas de crecimiento descritas, se utilizó el triple mutante 10SYOt para determinar su capacidad de respuesta a un incremento súbito de la osmolaridad del medio en comparación con la cepa parental 1021. Para este tipo de estudios, se dejaron crecer los cultivos en medio mínimo líquido hasta una DO_{600nm} de aproximadamente 0,4, momento en el que se adicionó NaCl hasta alcanzar la concentración final deseada (400 mM, 500 mM o 600 mM) y se continuó determinando el crecimiento de la cepa como función de la D.O._{600nm} a lo largo del tiempo. De las tres concentraciones empleadas, sólo la más alta provocó un retraso apreciable del crecimiento del mutante respecto a la cepa parental (Fig. R3.7), lo que indica un efecto del estrés osmótico sobre el mutante también en estas condiciones aunque dicho efecto se observa a concentraciones de NaCl aun más elevadas que las necesarias cuando el osmolito se añade al comienzo de la curva de crecimiento.

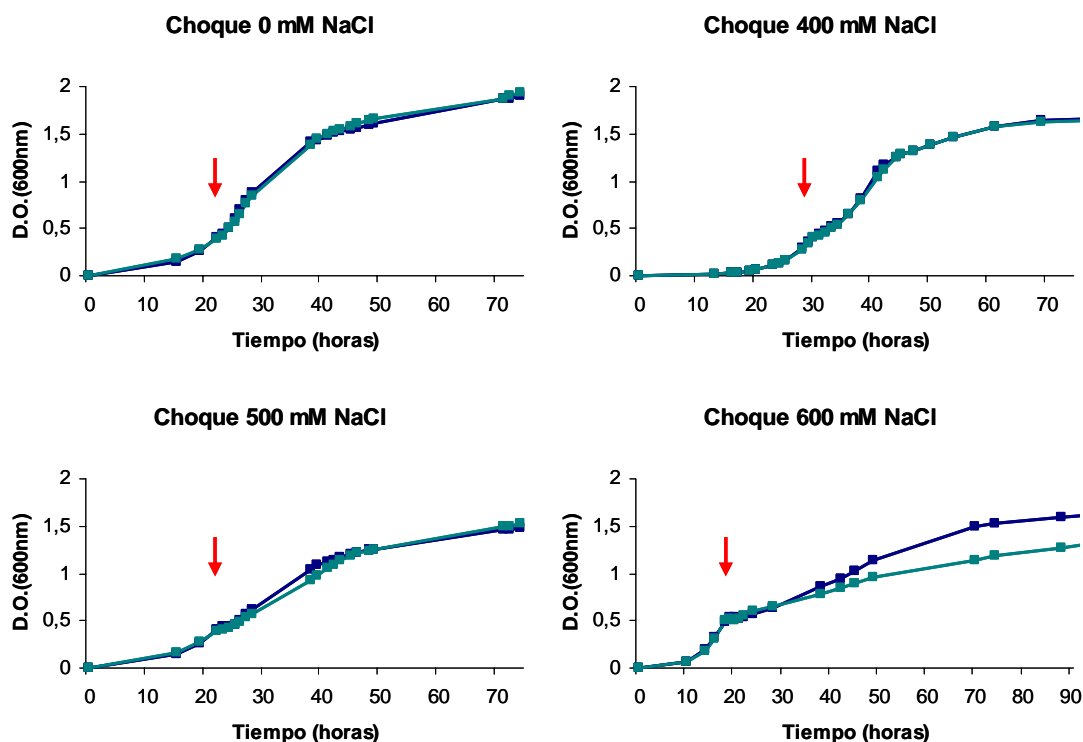


Figura R3.7.- Curvas de crecimiento de *S. meliloti* 1021 (■) y 10SYOt (TreS⁻, TreY⁻, OtsA⁻) (■) en medio mínimo al que se adicionó NaCl hasta alcanzar la concentración indicada en el momento que señala la flecha roja.

También se estableció la respuesta del triple mutante 10SYOt a condiciones de estrés osmótico en presencia de trehalosa en el medio (Fig. R3.8). La trehalosa se ha descrito como un osmoprotector no acumulado en *S. meliloti*, de modo que la presencia de bajas concentraciones de este compuesto en el medio de cultivo es capaz de aliviar los efectos del estrés osmótico (Gouffi *et al.*, 1999). En estos experimentos se llevaron a cabo curvas de crecimiento en medio mínimo líquido adicionado o no de 500 mM NaCl y en presencia o ausencia de 5 mM trehalosa. Se pudo determinar que la adición de trehalosa produjo un efecto osmoprotector tanto en la cepa parental como en el mutante, aunque el crecimiento de 10SYOt no llegó a alcanzar las tasas de la cepa parental en condiciones hiperosmóticas incluso en presencia del osmoprotector.

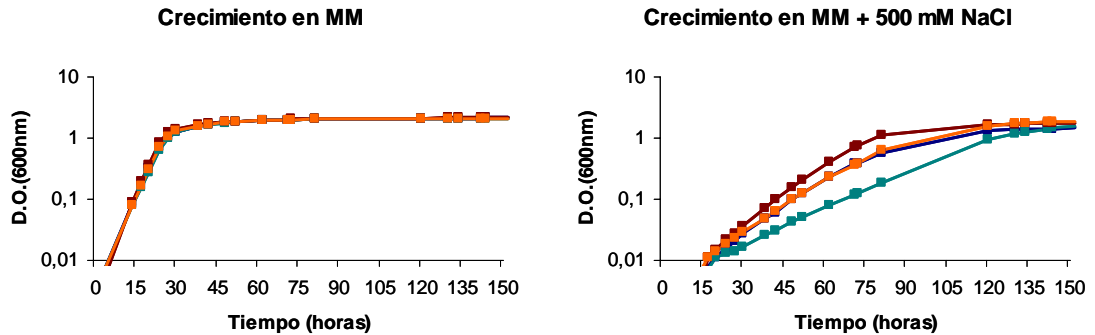


Figura R3.8.- Efecto protector de la trehalosa exógena sobre el crecimiento de *S. meliloti*. Se representan las curvas de crecimiento en medio mínimo en presencia (1021 ■ y 10SYOt ■) o ausencia (1021 ■ y 10SYOt ■) de 5 mM de trehalosa.

3.2.2. Crecimiento de los mutantes de *S. meliloti* 1021 en medio sólido

La capacidad de osmoadaptación de los mutantes obtenidos se determinó también sobre placas de medio mínimo tamponado con una combinación de Tris y MES (5 mM) a pH 6, pH 6,5 o pH 7. Para cada uno de estos tres pH se prepararon placas con NaCl (300 mM, 400 mM y 500 mM) o sacarosa (500 mM, 600 mM y 700 mM). En cada placa se compararon varios mutantes con la cepa parental colocando gotas de 10 μ l de diluciones seriadas (desde unas 10^2 hasta 10^5 ufc) de tal modo que cada columna representaba una de las cepas ensayadas y cada fila, una dilución. En todas las placas se incluyó la cepa parental, *S. meliloti* 1021, como referencia y se utilizó como control el correspondiente medio sin NaCl o sacarosa añadidos (Fig. R3.9).

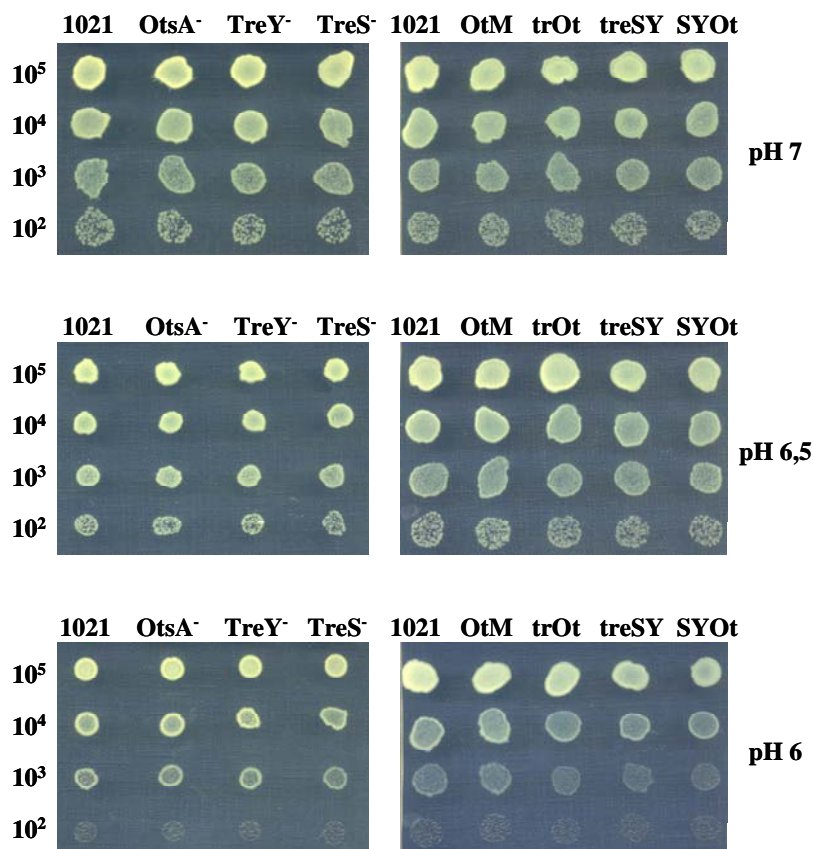


Figura R3.9.- Crecimiento de los mutantes de *S. meliloti* en genes de síntesis de trehalosa en medio mínimo sólido a distintos pHs. En cada fila, las gotas contienen aproximadamente el número de ufc indicado a la izquierda. Cada columna corresponde a la cepa que se señala en la parte superior de la imagen.

OtM: OtsA⁻, TreY⁻; **trOt:** TreS⁻, OtsA⁻; **treSY:** TreS⁻, TreY⁻; **SYOt:** TreS⁻, TreY⁻, OtsA⁻.

Las concentraciones más bajas de los solutos ensayados (300 mM NaCl y 500 mM sacarosa) tampoco produjeron diferencias detectables en el crecimiento de ninguno de los mutantes (datos no mostrados). A las siguientes concentraciones de solutos ensayadas (400 mM NaCl y 600 mM sacarosa) sí se pudieron observar algunas diferencias interesantes (Fig. R3.10 y R3.11). A pH 6,5 se comienza a apreciar un retraso en el crecimiento del triple mutante 10SYOt (TreS⁻, TreY⁻, OtsA⁻) en presencia de 400 mM NaCl y a pH 6 se observan claras diferencias en la capacidad de crecimiento de los mutantes 10OtSS (OtsA⁻), 10trOt (TreS⁻, OtsA⁻), 10OtM (OtsA⁻, TreY⁻) y 10SYOt (TreS⁻, TreY⁻, OtsA⁻) en estas condiciones (Fig. R3.10).

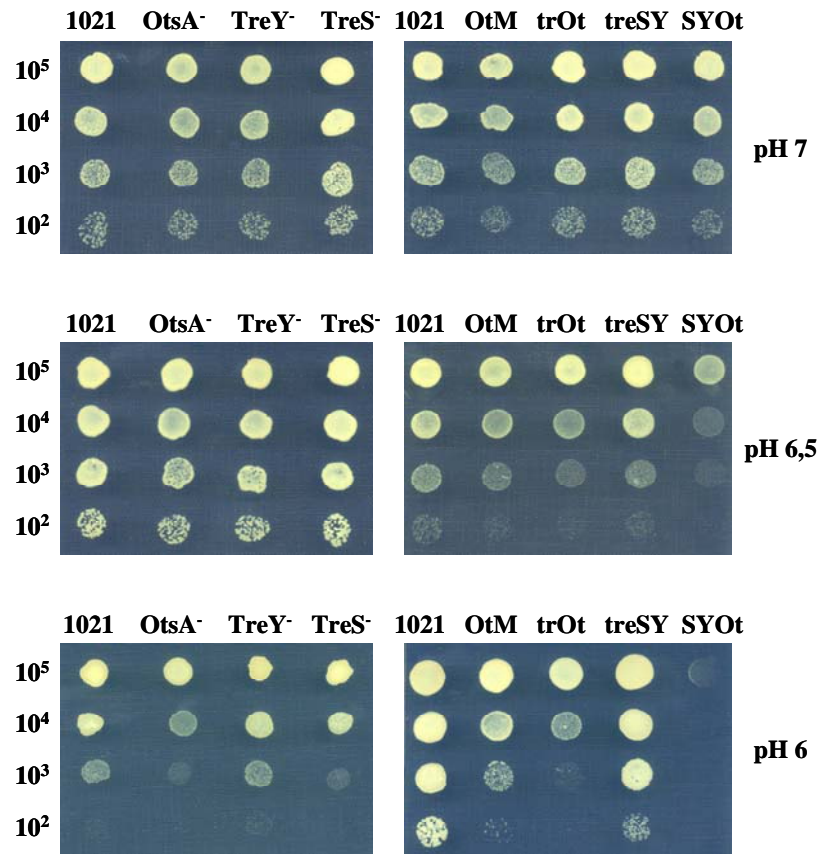


Figura R3.10.- Crecimiento de los mutantes de *S. meliloti* en genes de síntesis de trehalosa en medio mínimo sólido a distintos pHs y adicionado de 400 mM NaCl. Cada gota contiene aproximadamente el número de ufc indicado a la izquierda. Las columnas corresponden a la cepa que se señala en la parte superior de la imagen.

OtM: OtsA⁻, TreY⁻; **trOt:** TreS⁻, OtsA⁻; **treSY:** TreS⁻, TreY⁻; **SYOt:** TreS⁻, TreY⁻, OtsA⁻.

La adición de sacarosa al medio tuvo un efecto menor que la de NaCl pero se pudo apreciar un menor crecimiento de los mismos mutantes en presencia de 600 mM sacarosa a pH 6: 10OtSS (OtsA⁻), 10trOt (TreS⁻, OtsA⁻), 10OtM (OtsA⁻, TreY⁻) y 10SYOt (TreS⁻, TreY⁻, OtsA⁻) (Fig. R3.11).

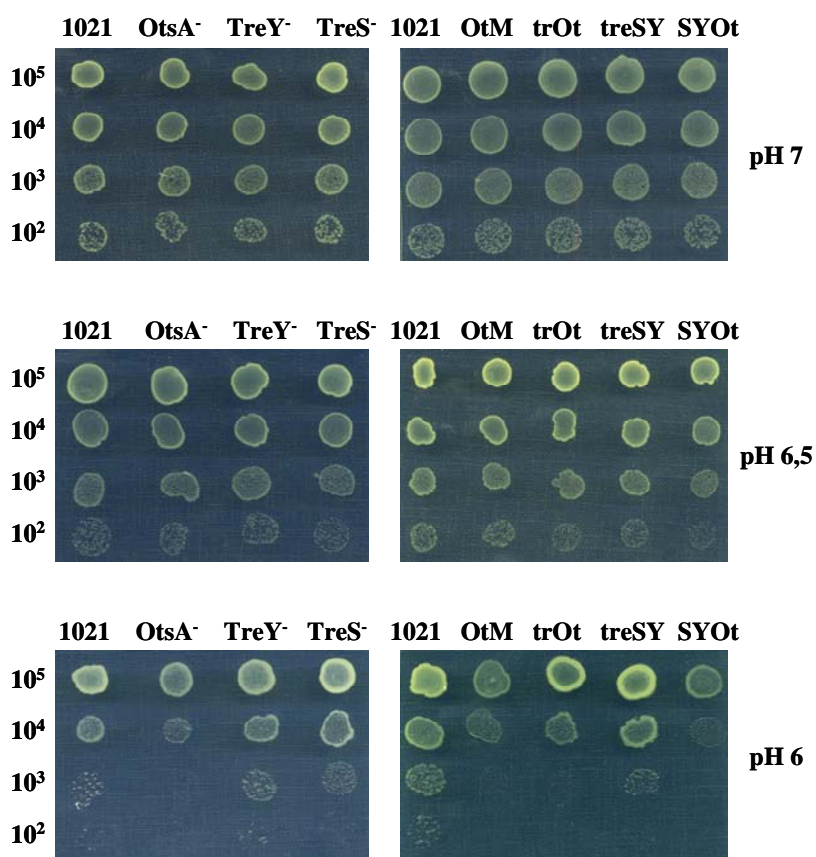


Figura R3.11.- Crecimiento de los mutantes de *S. meliloti* en genes de síntesis de trehalosa en medio mínimo sólido a distintos pHs y adicionado de 600 mM sacarosa. En cada fila, las gotas contienen aproximadamente el número de ufc indicado a la izquierda. Cada columna corresponde a la cepa que se señala en la parte superior de la imagen.

OtM: OtsA⁻, TreY⁻; **trOt:** TreS⁻, OtsA⁻; **treSY:** TreS⁻, TreY⁻; **SYOt:** TreS⁻, TreY⁻, OtsA⁻.

La concentración de soluto necesaria para producir un efecto fue más baja conforme disminuyó el pH del medio probablemente porque el estrés aumenta en estas condiciones. De hecho, la cepa parental fue incapaz de crecer en las concentraciones más elevadas de solutos (500 mM NaCl y 700 mM sacarosa) a pH 6 por lo que sólo se presentan las imágenes de crecimiento en estas concentraciones a pH 7 y pH 6,5 (Fig. R3.12 y R3.13).

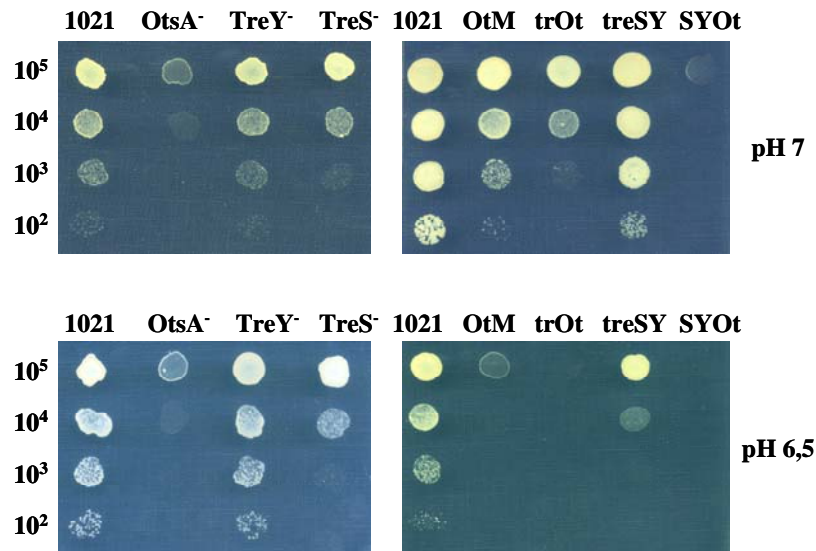


Figura R3.12.- Crecimiento de los mutantes de *S. meliloti* en genes de síntesis de trehalosa en medio mínimo sólido a distintos pHs y adicionado de 500 mM NaCl. Cada gota contiene aproximadamente el número de ufc indicado a la izquierda. Cada columna corresponde a la cepa que se señala en la parte superior de la imagen.

OtM: *OtsA*⁻, *TreY*⁻; **trOt:** *TreS*⁻, *OtsA*⁻; **treSY:** *TreS*⁻, *TreY*⁻; **SYOt:** *TreS*⁻, *TreY*⁻, *OtsA*⁻.

La adición de 500 mM NaCl al medio produjo diferencias en la capacidad de crecimiento de los mutantes antes listados y también del mutante simple 10*treS* (*TreS*⁻) (Fig. R3.12). En medio sólido se aprecian por primera vez diferencias en la capacidad de crecimiento de los mutantes simples 10*OtSS* (*OtsA*⁻) y 10*treS* (*TreS*⁻). Ambos mutantes se vieron afectados por la presencia de elevadas concentraciones de solutos. El mutante 10*OtSS* (*OtsA*⁻) resultó ser el más afectado mientras que el mutante 10*treS* (*TreS*⁻) presentó una ligera diferencia de crecimiento respecto a la parental que se observó con claridad a 500 mM NaCl. La capacidad de crecimiento del doble mutante 10*OtM* (*OtsA*⁻, *TreY*⁻) fue en todos los casos semejante a la del simple mutante 10*OtSS* (*OtsA*⁻) mientras que el doble mutante 10*trOt* (*TreS*⁻, *OtsA*⁻) presentó un retraso respecto a cualquiera de los dos mutantes simples 10*OtSS* o 10*treS* y el triple mutante 10*SYOt* (*TreS*⁻, *TreY*⁻, *OtsA*⁻) estaba aun más afectado que 10*trOt*.

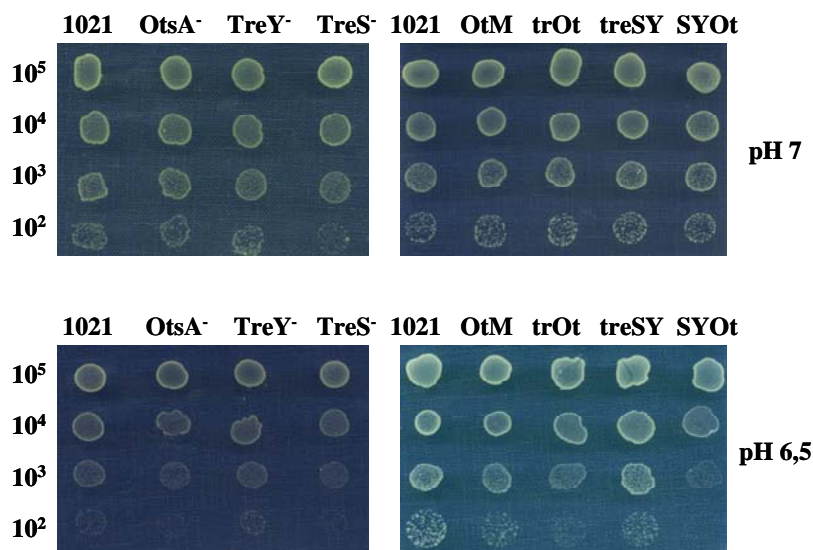


Figura R3.13.- Crecimiento de los mutantes de *S. meliloti* en genes de síntesis de trehalosa en medio mínimo sólido a distintos pHs y adicionado de 700 mM sacarosa. Cada gota contiene aproximadamente el número de ufc indicado a la izquierda. Cada columna corresponde a la cepa que se señala en la parte superior de la imagen.

OtM: OtsA⁻, TreY⁻; **trOt:** TreS⁻, OtsA⁻; **treSY:** TreS⁻, TreY⁻; **SYOt:** TreS⁻, TreY⁻, OtsA⁻.

3.3 Perfil de expresión de los genes *otsA* y *treY* de *S. meliloti* 1021

La construcción de las fusiones transcripcionales utilizadas para los estudios de expresión de los genes *otsA* y *treY* de *S. meliloti* 1021 se describe en el anexo 3.3.

La actividad β-glucuronidasa de dichas fusiones se determinó en el fondo genético de 1021 a lo largo de la curva de crecimiento en medio mínimo adicionado de 400 mM y 500 mM de NaCl. En todos los casos se incluyó la expresión a lo largo de la curva de crecimiento en medio mínimo como control. Los datos obtenidos en estas condiciones sobre la expresión de los genes *otsA* y *treY* se muestran en las figuras R3.14 y R3.15, respectivamente.

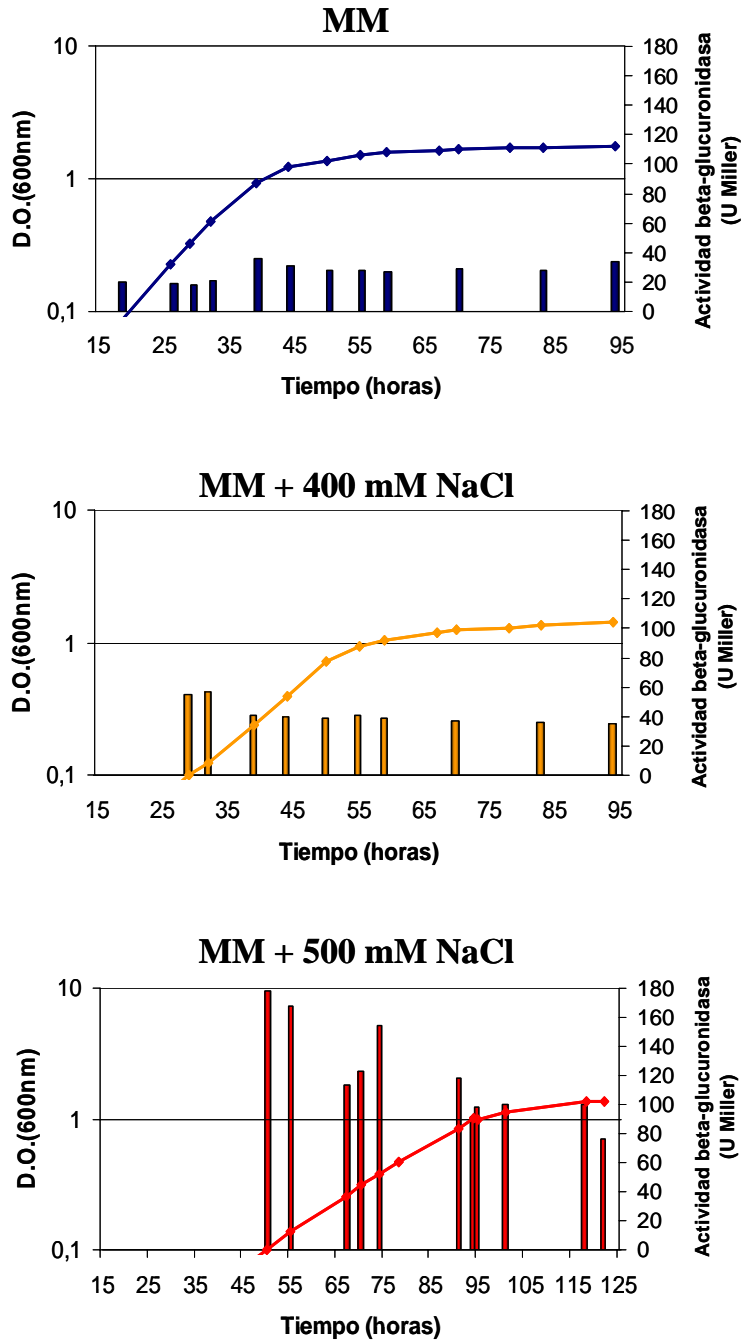


Figura R3.14.- Expresión de la fusión transcripcional *otsA::uidA* en *S. meliloti* 1021, en presencia o ausencia de NaCl. La curva de crecimiento se representa como una línea continua y las barras corresponden a los niveles de expresión según la escala de la derecha. Datos de un experimento representativo de dos repeticiones. Cada valor es la media de dos réplicas técnicas.

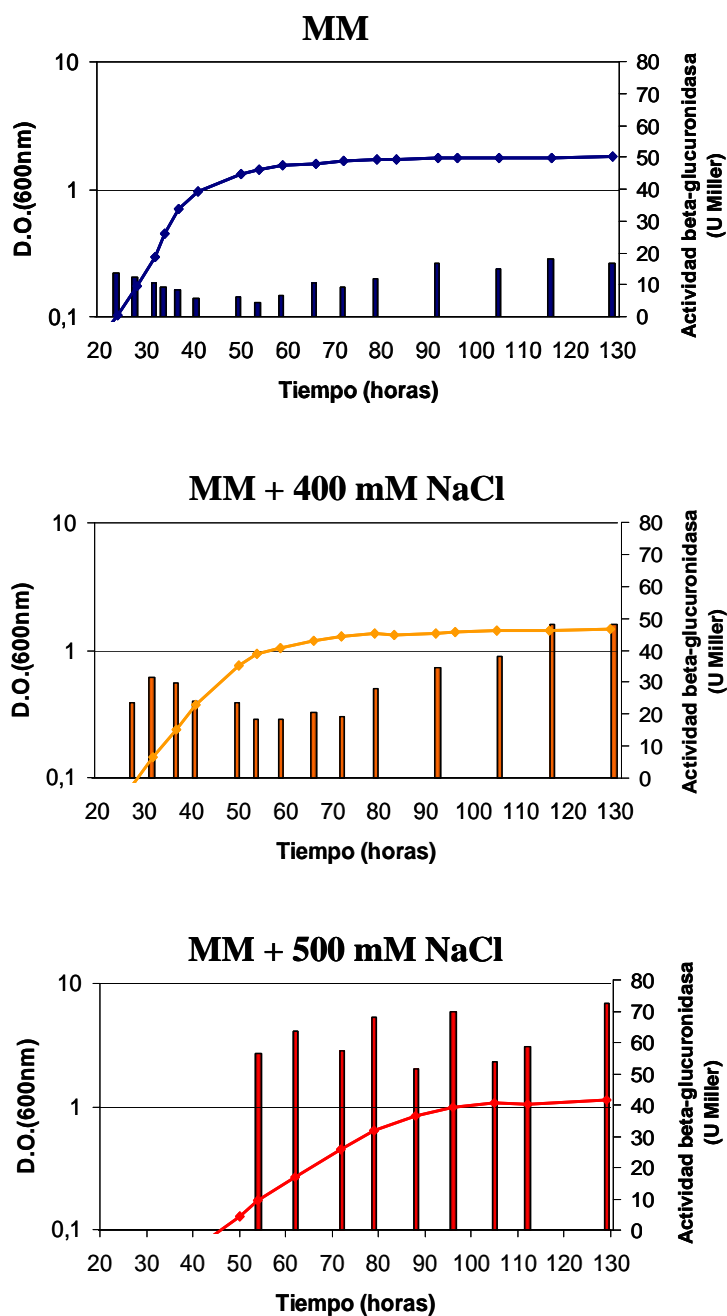


Figura R3.15.- Expresión de la fusión transcripcional *treY::uidA* en *S. meliloti* 1021, en presencia o ausencia de NaCl. La curva de crecimiento se representa como una línea continua y las barras corresponden a los niveles de expresión según la escala de la derecha. Datos de un experimento representativo de dos repeticiones. Cada valor es la media de dos réplicas técnicas.

Como se puede observar en la figura R3.14, la expresión del gen *otsA* en medio mínimo no varía significativamente a lo largo de la curva de crecimiento. La adición de 400 mM NaCl al medio de cultivo provoca un ligero incremento de la expresión de este gen, especialmente al comienzo de la fase de crecimiento logarítmico, mientras que la adición de 500 mM NaCl conduce a unos niveles de expresión 4 o 5 veces superiores a los observados en medio sin NaCl. La expresión del gen *otsA* en medio adicionado de 500 mM NaCl es máxima al comienzo de la curva de crecimiento y presenta una tendencia a disminuir a lo largo del tiempo.

El gen *treY* presenta unos niveles de expresión muy bajos a lo largo de la curva de crecimiento en medio mínimo pero dicha expresión aumenta 2 veces por la presencia de 400 mM NaCl en el medio y hasta 5 veces en medio con 500 mM NaCl (Fig. R3.15). Al contrario de lo observado en el caso del gen *otsA*, la expresión de *treY* parece mantenerse constante a lo largo de la curva de crecimiento tanto en ausencia como en presencia de NaCl.

Además de las curvas de crecimiento descritas, se utilizaron estas mismas construcciones para determinar la expresión de los genes *otsA* y *treY* en respuesta a un incremento súbito de la osmolaridad del medio (Fig. R3.16 y R3.17). En este tipo de estudios, los cultivos se crecieron en medio mínimo hasta una D.O._{600nm} de 0,4, momento en el que se adicionó NaCl hasta alcanzar la concentración final deseada. Para la curva control, se añadió una cantidad equivalente de medio fresco.

En la figura R3.16 se aprecia cómo la expresión del gen *otsA* aumenta significativamente tras la adición de NaCl. La respuesta provocada por la concentración más elevada de NaCl es más lenta pero más intensa que la causada por 500 mM NaCl. En ambos casos podemos observar que se alcanza un máximo de expresión unas 30-40 horas después del choque osmótico llegando a un valor aproximado de 250 unidades Miller en medio adicionado de 500 mM NaCl y de 350 unidades Miller en medio adicionado de 600 mM NaCl. Posteriormente los niveles de expresión disminuyen progresivamente hasta unas 100 unidades Miller en 500 mM NaCl y 200 unidades Miller en 600 mM NaCl. Este hecho puede relacionarse con el comportamiento observado durante el crecimiento continuo en medio con 500 mM NaCl (Fig. R3.14).

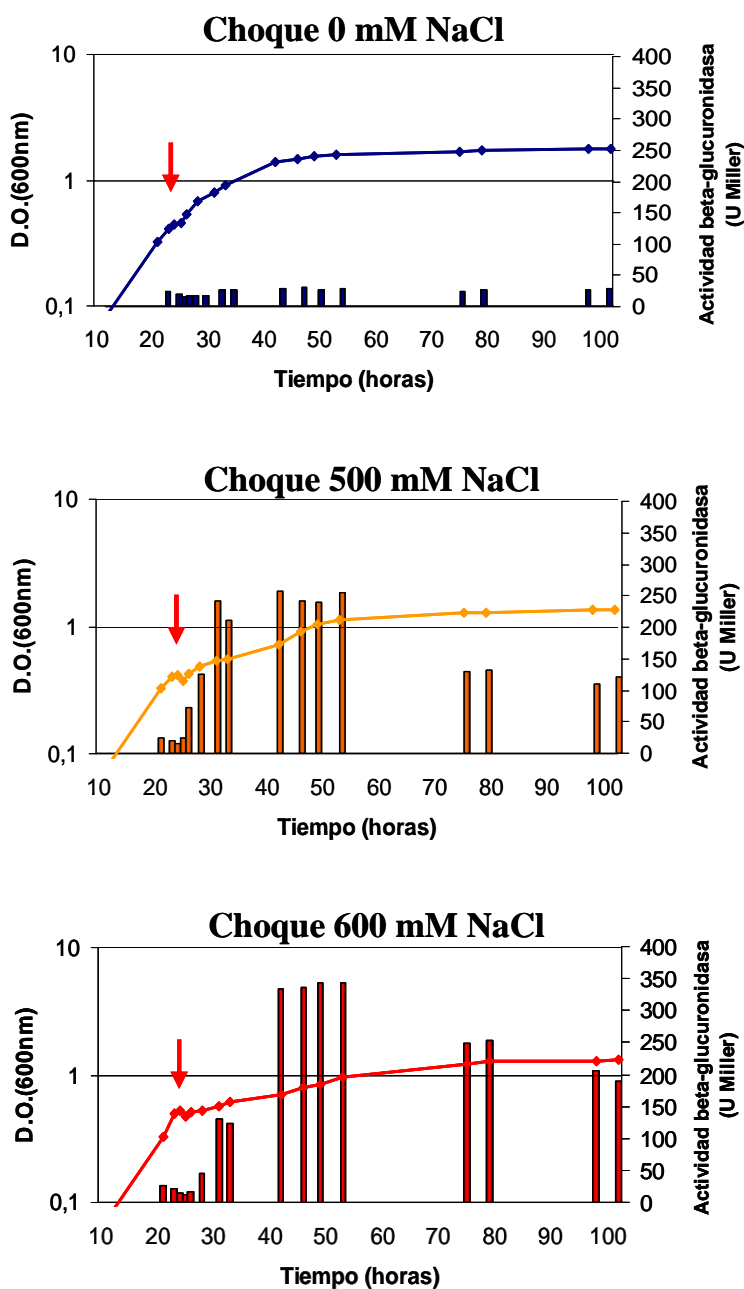


Figura R3.16.- Expresión de la fusión transcripcional *otsA::uidA* en *S. meliloti* 1021, en respuesta a la adición de NaCl durante la fase de crecimiento exponencial. La curva de crecimiento se representa como una línea continua y las barras corresponden a los niveles de expresión según la escala de la derecha. La flecha roja señala el momento de la adición de NaCl. Cada valor es la media de dos réplicas técnicas.

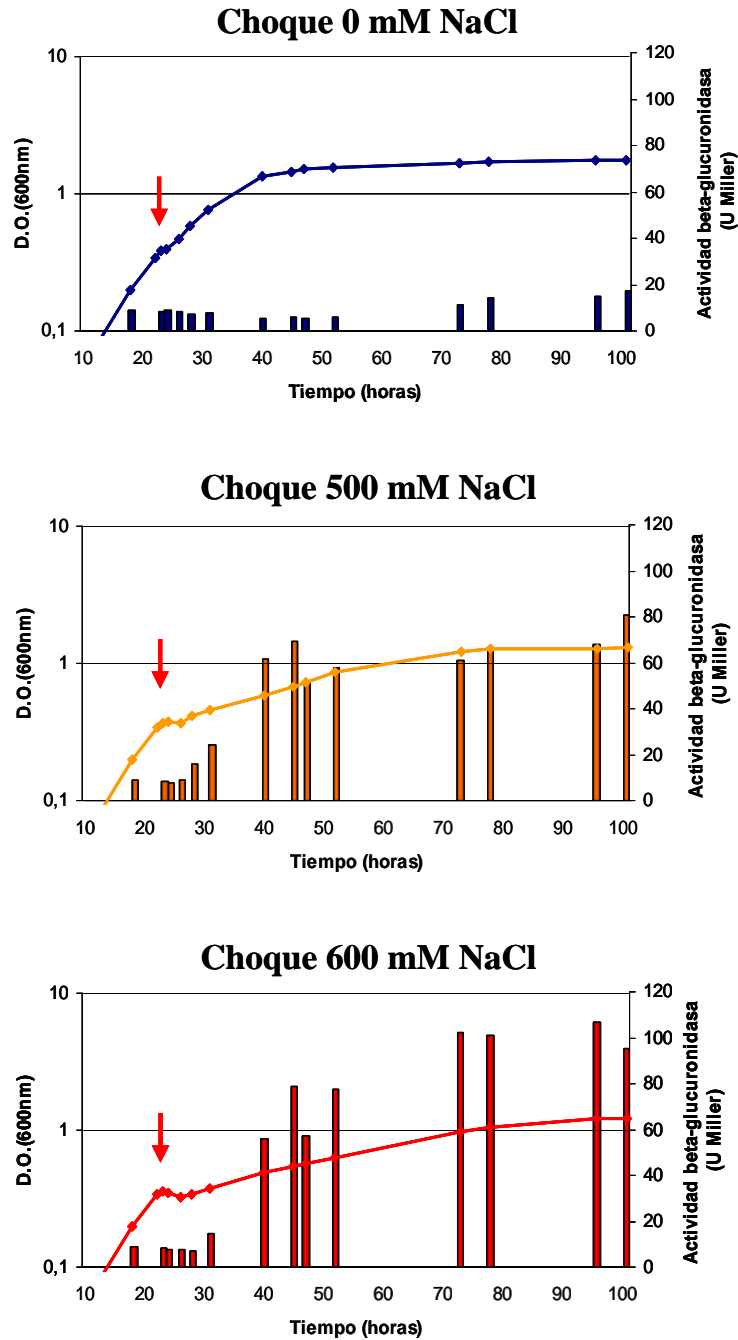


Figura R3.17.- Expresión de la fusión transcripcional *treY::uidA* en *S. meliloti* 1021, en respuesta a la adición de NaCl durante la fase de crecimiento exponencial. La curva de crecimiento se representa como una línea continua y las barras corresponden a los niveles de expresión según la escala de la derecha. La flecha roja señala el momento de la adición de NaCl. Cada valor es la media de dos réplicas técnicas.

La expresión del gen *treY* también aumenta tras la adición de NaCl, aunque más lentamente que la del gen *otsA* (Fig. R3.17). En concordancia con lo que se observa durante el crecimiento continuo en presencia de 500 mM NaCl (Fig. R3.15), los niveles de expresión máxima se mantienen a lo largo del tiempo hasta el final de la curva de crecimiento. De nuevo parece que la concentración más elevada de NaCl provoca una respuesta más intensa, ya que se alcanzan valores máximos de expresión superiores, pero más lenta que la respuesta a la concentración menor utilizada.

3.4 Acumulación de trehalosa en los mutantes de *S. meliloti* 1021

Se sabe que la acumulación de trehalosa como respuesta a la aplicación de un estrés osmótico en *S. meliloti* depende de la fase de crecimiento (Talibart *et al.*, 1997). Sin embargo, tal y como se describe en el apartado 3.3, no se detectaron variaciones en la expresión de los genes *otsA* y *treY* a lo largo de la curva de crecimiento, por lo que se decidió estudiar la acumulación de trehalosa por *S. meliloti* 1021 durante su crecimiento en condiciones no estresantes (Fig. R3.18).

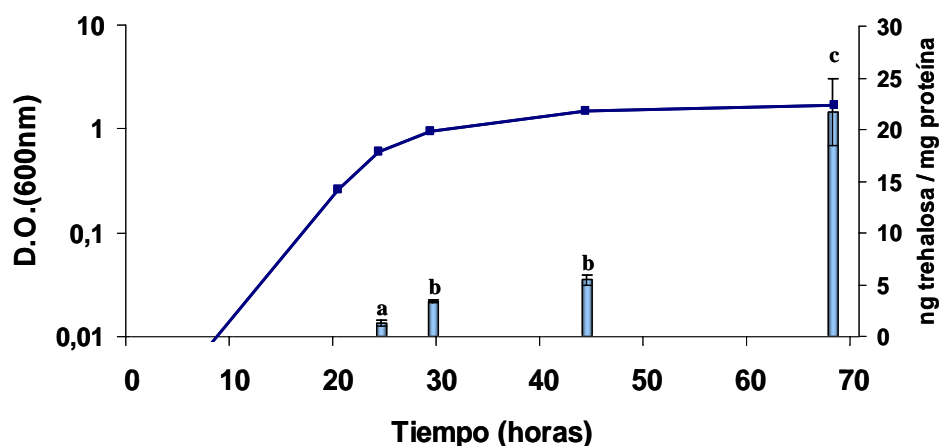


Figura R3.18.- Trehalosa acumulada por *S. meliloti* 1021 durante su crecimiento en medio mínimo. La curva de crecimiento se representa como una línea continua y las barras corresponden a los niveles de trehalosa según la escala de la derecha. Índices distintos señalan diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ($P < 0,01$).

Se pudo observar que *S. meliloti* 1021 en condiciones no estresantes acumulaba cantidades mínimas de trehalosa durante la fase de crecimiento exponencial; estos niveles experimentaron un ligero aumento durante la entrada en fase estacionaria y se produjo un fuerte incremento de la cantidad de trehalosa acumulada en la fase estacionaria tardía. Estos datos no se corresponden con los niveles de expresión génica observados en el apartado 3.3, y, aunque existe la posibilidad de que se relacionen con un aumento de la expresión de *treS*, sugieren la existencia de una regulación posttranscripcional de los sistemas de síntesis de trehalosa o bien que la acumulación de trehalosa pueda relacionarse con la regulación de los sistemas implicados en su catabolismo.

Se planteó la posibilidad de que la acumulación de trehalosa durante la adaptación a estrés osmótico variase también respecto a lo observado en el caso de la expresión génica por lo que se decidió determinar trehalosa en cultivos de *S. meliloti* 1021 sometidos a un choque osmótico utilizando distintas concentraciones de NaCl (Fig. R3.19). Para ello, se dejaron crecer los cultivos hasta una D.O._{600nm} de 0,4 y en ese momento se adicionó NaCl hasta alcanzar la concentración deseada. La trehalosa acumulada se determinó 25-30 horas después del choque osmótico.

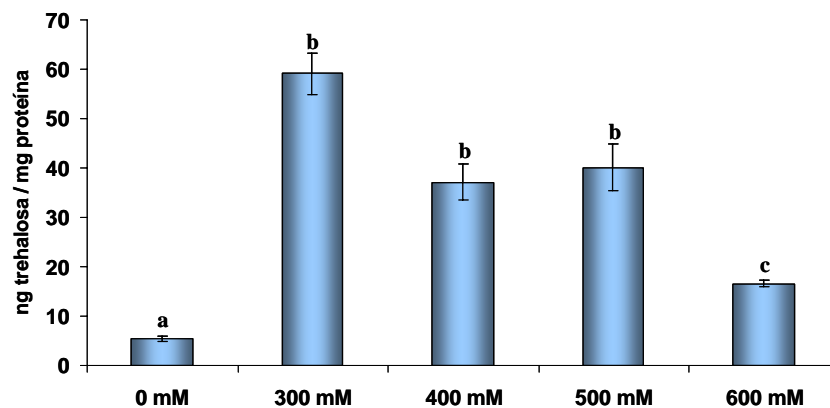


Figura R3.19.- Trehalosa acumulada por *S. meliloti* 1021 30 horas después de un choque osmótico utilizando la concentración de NaCl que se indica. Índices distintos señalan diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ($P < 0,01$).

La cantidad de trehalosa acumulada por *S. meliloti* aumentó significativamente en respuesta a un choque osmótico. La adición de 300 mM, 400 mM o 500 mM NaCl condujo a unos niveles máximos de la concentración de trehalosa. Dicha concentración fue significativamente menor en el caso de cultivos estresados por la adición de 600 mM NaCl, aunque en estas condiciones también se pudieron detectar niveles de trehalosa superiores a los presentes en los cultivos que no habían sido sometidos a estrés.

De nuevo se puede observar que la acumulación de trehalosa responde a un patrón distinto del observado para la expresión génica de *otsA* y *treY*, aunque en este caso es posible que la menor concentración de trehalosa detectada en células estresadas por la adición de 600 mM NaCl se deba a las deficiencias metabólicas que podrían asociarse con la aplicación de un estrés de gran intensidad. Para estudiar la implicación de cada uno de los sistemas de síntesis de trehalosa durante la adaptación a un choque osmótico de gran intensidad, se determinó la cantidad de dicho compuesto acumulada por cada uno de los mutantes obtenidos en las condiciones que habían inducido una expresión máxima de los genes *otsA* y *treY*, es decir, 25-30 horas tras un aumento súbito de la osmolaridad del medio hasta 600 mM NaCl (Fig. R3.20).

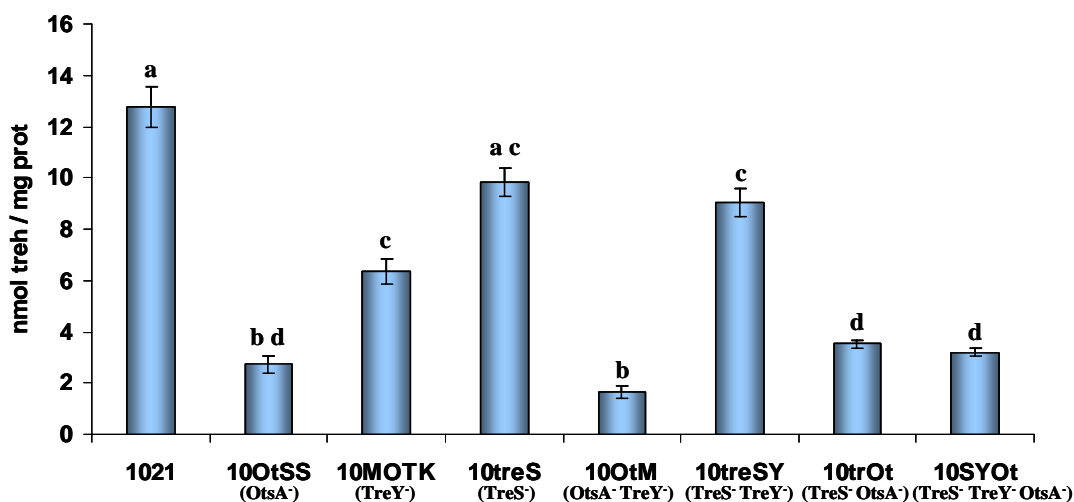


Figura R3.20.- Trehalosa acumulada en los mutantes de *S. meliloti* 1021 en respuesta a la adición de 600 mM NaCl durante la fase de crecimiento exponencial. Índices distintos señalan diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor (P<0,01).

La cantidad de trehalosa acumulada por los mutantes en respuesta a estrés osmótico fue menor que la acumulada por la cepa parental con la única excepción del mutante 10treS (TreS⁻). Este mutante mostró una cierta tendencia a acumular niveles más bajos de trehalosa que *S. meliloti* 1021, aunque no llegó a presentar diferencias significativas. En el doble mutante 10treSY (TreS⁻, TreY⁻) tampoco se apreció un efecto de la mutación de TreS. 10treSY acumuló una cantidad de trehalosa comparable a la del mutante simple 10MOTK (TreY⁻) y claramente inferior a la acumulada por la cepa parental. El mutante 10OtsSS (OtsA⁻) presentó una grave deficiencia en su capacidad de acumulación de trehalosa y no pudieron apreciarse diferencias significativas en la cantidad de trehalosa acumulada por los mutantes carentes de OtsA en combinación con cualquier otra mutación respecto a la del mutante simple, por lo que se puede decir que la ausencia de este sistema es suficiente para conducir a la acumulación de unos niveles de trehalosa mínimos.

Los resultados obtenidos indican que la acumulación de trehalosa en estas condiciones es debida mayoritariamente a la actuación del sistema OtsA. Existe así mismo una implicación del sistema TreY en este proceso, como cabía esperar dado el aumento de la expresión del gen *treY* observado anteriormente. Sin embargo, no pudo detectarse ningún efecto de la mutación del sistema TreS sobre la acumulación de trehalosa en los experimentos realizados, aunque dicha mutación sí se relaciona con una menor capacidad de osmoadaptación de las cepas portadoras en vida libre. Es posible que este sistema se encuentre implicado en la acumulación de trehalosa en respuesta a condiciones distintas a las ensayadas, por ejemplo la adaptación a una menor osmolaridad, aunque también podría ejercer su efecto de un modo indirecto que no implicase la acumulación de trehalosa.

3.5 Comportamiento simbiótico de los mutantes de *S. meliloti* 1021

Todos los mutantes en sistemas de síntesis de trehalosa de *S. meliloti* fueron capaces de formar nódulos fijadores de nitrógeno en raíces de alfalfa (*Medicago sativa*). Con todos estos mutantes se llevaron a cabo experimentos de infectividad en los que se estableció la cinética de nodulación de cada uno de ellos respecto a la cepa parental. Dado que la capacidad de nodulación de todos los mutantes estudiados fue igual a la de la cepa parental, se decidió llevar a cabo estudios de competitividad sólo con los mutantes dobles y el mutante triple y puesto que en estos experimentos el único mutante afectado fue el mutante triple, éste fue seleccionado para estudiar su eficiencia en la fijación de nitrógeno.

3.5.1. Infectividad de los mutantes en sistemas de síntesis de trehalosa

Las plantas de alfalfa (*M. sativa* var. Aragón) se inocularon con unas 10^6 ufc/ml. Las cinéticas de nodulación obtenidas se muestran en la figura R3.21. En todos los casos se observó una tendencia de los mutantes a formar menos nódulos que la cepa parental pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Se decidió estudiar además la capacidad del triple mutante para nodular raíces de alfalfa en condiciones hiperosmóticas. En estos experimentos, se adicionó NaCl a cada tubo de cultivo en el momento de la inoculación hasta alcanzar una concentración de 75 mM. Tampoco en estas condiciones se observaron diferencias significativas respecto a la cepa parental *S. meliloti* 1021 (Fig. R3.22).

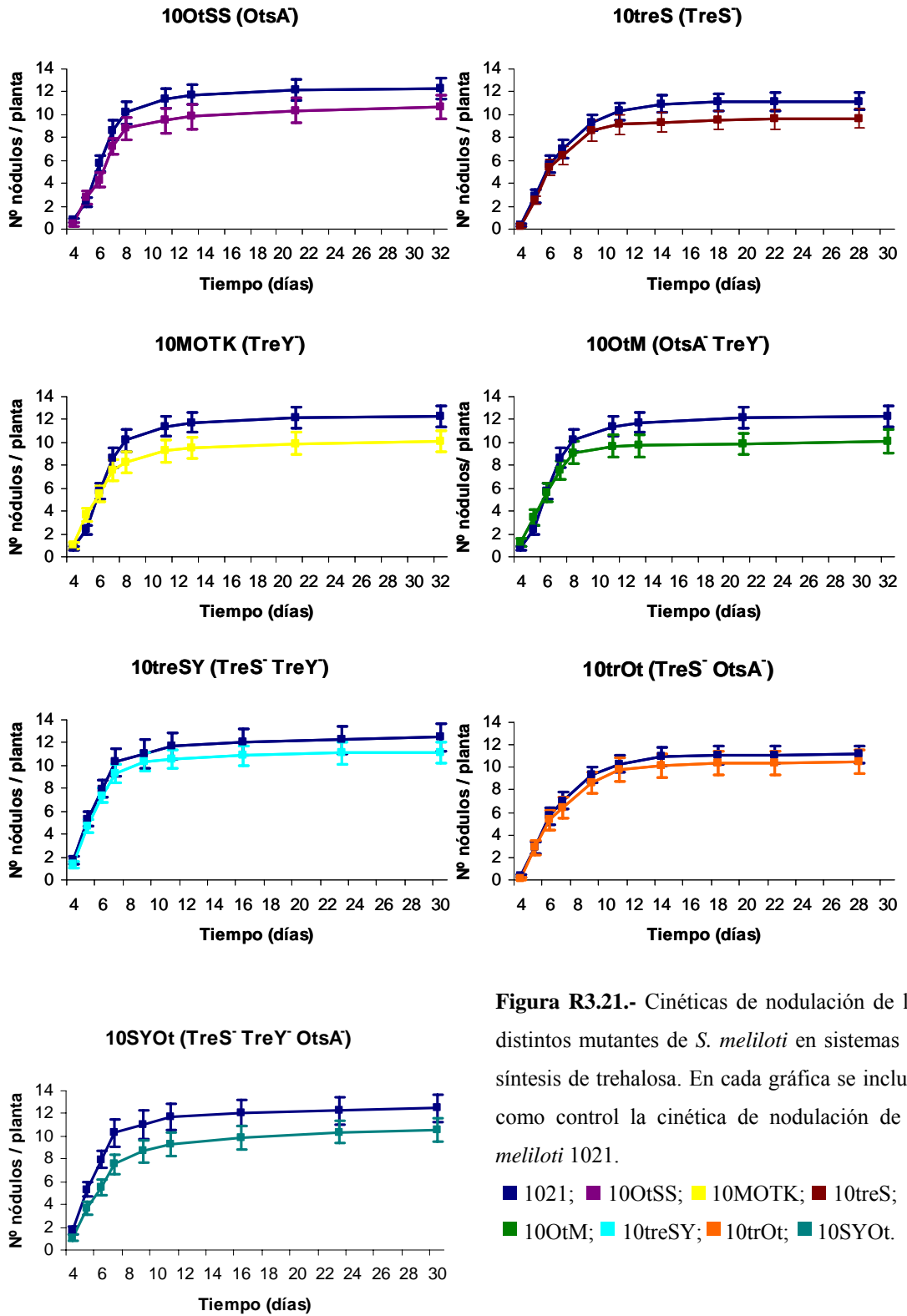


Figura R3.21.- Cinéticas de nodulación de los distintos mutantes de *S. meliloti* en sistemas de síntesis de trehalosa. En cada gráfica se incluye como control la cinética de nodulación de *S. meliloti* 1021.

■ 1021; ■ 100tSS; ■ 10MOTK; ■ 10treS;
 ■ 100tM; ■ 10treSY; ■ 10trOt; ■ 10SYOt.

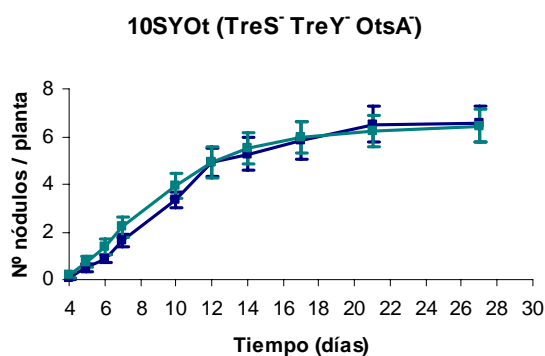


Figura R3.22.- Cinética de nodulación del triple mutante 10SYOt (TreS⁻, TreY⁻, OtsA⁻) en solución nutritiva adicionada de 75 mM NaCl en el momento de la inoculación. Se incluye como control la cinética de nodulación de *S. meliloti* 1021 en las mismas condiciones.

■ 1021; ■ 10SYOt.

3.5.2. Competitividad de los mutantes en sistemas de síntesis de trehalosa

Puesto que el comportamiento de todos los mutantes resultó ser semejante al de la cepa parental en cuanto a su capacidad de nodulación con plantas de alfalfa, se decidió estudiar la competitividad exclusivamente en los mutantes dobles y el mutante triple en sistemas de síntesis de trehalosa. Estos mutantes así como la cepa parental *S. meliloti* 1021 se coinocularon con una cepa 1021 (pGUS3) en una proporción 1:1. El porcentaje de nódulos ocupados por cada una de las cepas estudiadas se determinó transcurridos 15 días desde la inoculación (Fig. R3.23). Se puede observar una disminución de la competitividad del doble mutante 10trOt (TreS⁻, OtsA⁻) y del triple mutante 10SYOt (TreS⁻, TreY⁻, OtsA⁻), aunque dicha disminución sólo fue significativa en el caso del triple mutante.

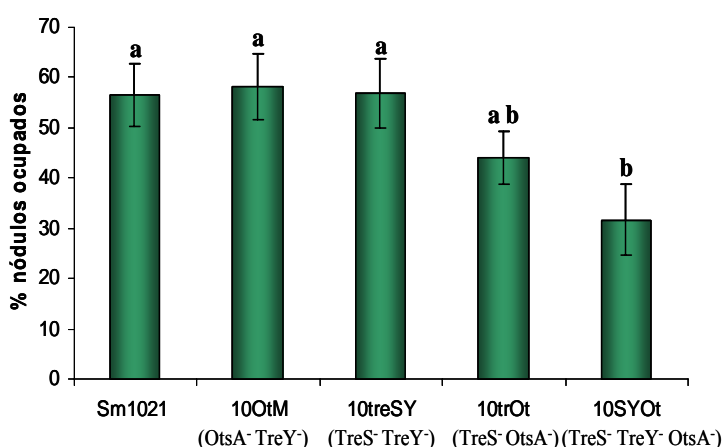


Figura R3.23.- Porcentaje de ocupación de nódulos de los mutantes dobles y el triple en sistemas de síntesis de trehalosa de *S. meliloti* tras inocular con la cepa 1021 (pGUS3) en una proporción 1:1. La cepa parental se incluye como referencia.

Índices distintos señalan diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor (P>0,05).

3.5.3. Eficiencia simbiótica del triple mutante 10SYOt

Dadas las mínimas diferencias observadas en el comportamiento simbiótico de los mutantes analizados respecto a la cepa parental, se decidió llevar a cabo un estudio de la eficiencia simbiótica del mutante triple en el que se encontraban inactivadas todas las rutas conocidas de síntesis de trehalosa. Para establecer la eficiencia simbiótica del triple mutante 10SYOt (TreS⁻, TreY⁻, OtsA⁻), se determinó tanto el peso seco de la parte aérea (PSPA) como la actividad reductora de acetileno (ARA) y el número de nódulos de plantas inoculadas con la cepa mutante o su parental 1021 en presencia o ausencia de 75 mM NaCl. Para ello, las plantas se crecieron en 2 sistemas distintos: cultivo hidropónico y jarras Leonard con vermiculita como sustrato.

En el sistema de jarras Leonard, se colocaron 8 plántulas de alfalfa por jarra y se inocularon 4 jarras por cada cepa (*S. meliloti* 1021 y 10SYOt). Se emplearon como control negativo 2 jarras sin inocular. Las condiciones hiperosmóticas se impusieron mediante la adición de NaCl hasta una concentración final de 75 mM con la solución de riego 3 semanas después de la inoculación. Las plantas se cosecharon 7 semanas después de la inoculación, se pesó la parte aérea, se contaron los nódulos formados y se determinó la actividad reductora de acetileno por nódulo (Fig. R3.24A).

La eficiencia simbiótica del triple mutante también se estudió en un sistema de tubos utilizando 24 plantas por cada cepa y midiendo los parámetros ya indicados en ausencia y presencia de 75 mM de NaCl que se adicionó a cada tubo en el momento de la inoculación. En este caso, las plantas se cosecharon 4 semanas después de la inoculación (Fig. R3.24B).

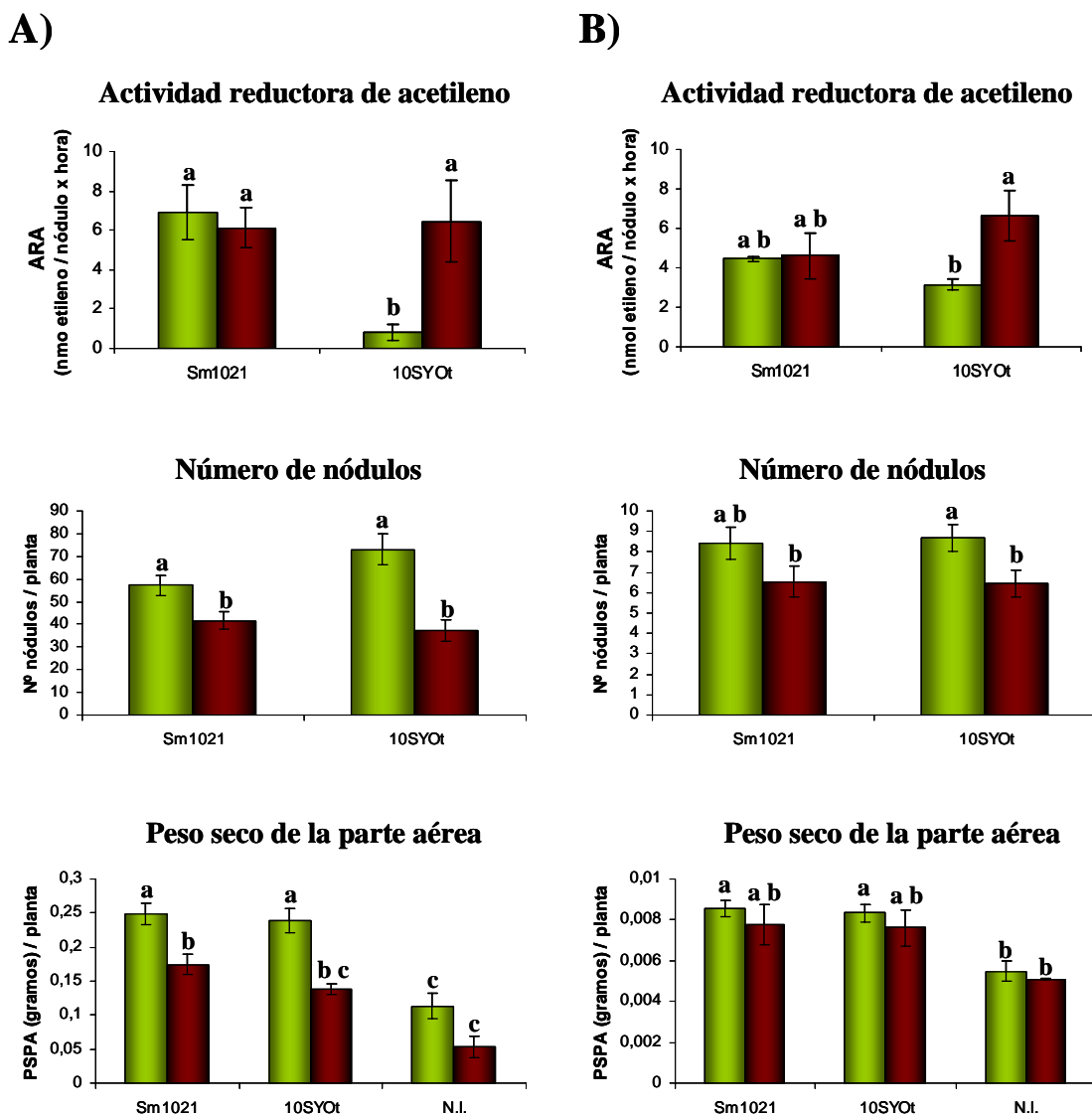


Figura R3.24.- Representación de la actividad reductora de acetileno (ARA), el número de nódulos por planta y el peso seco de la parte aérea (PSPA) de plantas de *M. sativa* (var. Aragón) inoculadas con *S. meliloti* 1021 o 10SYOt (TreS⁻, TreY⁻, OtsA⁻) en ausencia (barras verdes) o presencia (barras granates) de 75 mM de NaCl. Índices distintos señalan diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor (P<0,05).

A) Valores obtenidos utilizando un sistema de jarras Leonard para el cultivo de plantas.

B) Valores obtenidos utilizando un sistema de cultivo axénico en tubos para el cultivo de plantas.

En el sistema de jarras Leonard resultó especialmente llamativa la menor actividad ARA que presenta el mutante respecto a la cepa parental en condiciones no estresantes.

Sin embargo, este hecho no se tradujo en una disminución del peso seco de la parte aérea de la planta, lo que podría relacionarse en parte con un ligero aumento del número de nódulos formado por la cepa mutante respecto a la cepa parental, aunque debe señalarse que dicho aumento no llegó a ser estadísticamente significativo y que la actividad reductora de acetileno por planta también fue menor en estas condiciones (datos no mostrados).

Las plantas sometidas a un estrés hiperosmótico en jarras Leonard formaron un menor número de nódulos. En este caso, tampoco se observaron diferencias entre el número de nódulos formado por la cepa parental y la mutante tal y como había ocurrido durante los estudios de infectividad descritos en el apartado 3.5.1. Los pesos de las plantas inoculadas con una u otra cepa también fueron semejantes y las medidas de actividad reductora de acetileno fueron parecidas a las registradas en ausencia de NaCl en los nódulos formados por la cepa parental y significativamente superiores en el caso del mutante 10SYOt, cuya actividad reductora de acetileno en presencia de NaCl fue similar a la de la cepa parental.

Los resultados de los experimentos llevados a cabo en tubos fueron parecidos a los obtenidos en jarras Leonard, aunque las diferencias entre ambas cepas y entre las dos condiciones empleadas resultaron en general menos patentes. Como ya se indicó en el apartado 3.5.1, el triple mutante 10SYOt originó el mismo número de nódulos que la cepa parental en ambas condiciones. El peso de la parte aérea de las plantas tampoco varió significativamente aunque sí se observa que, en ausencia de NaCl, los nódulos formados por el mutante tienen una actividad reductora de acetileno ligeramente inferior a la de los formados por la cepa parental. En condiciones hiperosmóticas dicha actividad aumentó significativamente en el mutante mientras que en la cepa parental no resultó afectada por la adición de NaCl.

3.6 Capacidad de osmoadaptación en vida libre de mutantes en sistemas de síntesis de trehalosa de *M. loti*

3.6.1. Crecimiento de los mutantes de *M. loti* MAFF303099 en medio líquido

Para la determinación de la capacidad de osmoadaptación de los mutantes de *M. loti* en sistemas de síntesis de trehalosa, se llevaron a cabo curvas de crecimiento en medio mínimo adicionado de 150 mM NaCl, 200 mM NaCl, 250 mM NaCl, 300 mM sacarosa, 400 mM sacarosa y 500 mM sacarosa con cada uno de los dos mutantes obtenidos (Fig. R3.26 y R3.27). Cada tubo se inoculó con 10^6 - 10^7 ufc de la cepa de interés y el crecimiento se estableció como una función de la D.O._{600nm} medida a lo largo de 150-200 horas. En todos los casos se incluyó la cepa parental (*M. loti* MAFF303099) como referencia y se llevó a cabo simultáneamente una curva de crecimiento en medio mínimo como control (Fig. R3.25).

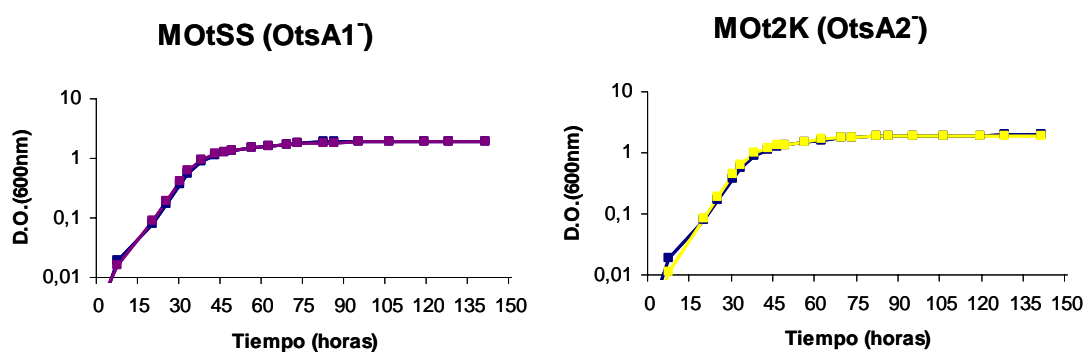


Figura R3.25.- Curvas de crecimiento en medio mínimo de los mutantes de *M. loti* en sistemas de síntesis de trehalosa. En cada gráfica se incluye como control la curva de crecimiento de *M. loti* MAFF303099.

■ MAFF303099; ■ MOtSS; ■ MOt2K.

El mutante MOtSS mostró un crecimiento comparable al de la cepa parental en todas las condiciones ensayadas (Fig. R3.26). En cambio, el mutante MOt2K presentó un retraso en su crecimiento respecto a la cepa parental en medios con altas concentraciones de NaCl o sacarosa (Fig. R3.27). En este caso, y al contrario de lo

observado en *S. meliloti*, el efecto sobre el crecimiento del mutante fue más claro ante la adición de sacarosa que de NaCl, aunque de nuevo se produjo únicamente cuando se utilizaron concentraciones muy elevadas del compuesto estresante. A concentraciones más bajas, el crecimiento de MOt2K fue indistinguible del de su parental MAFF303099 (Fig. R3.27).

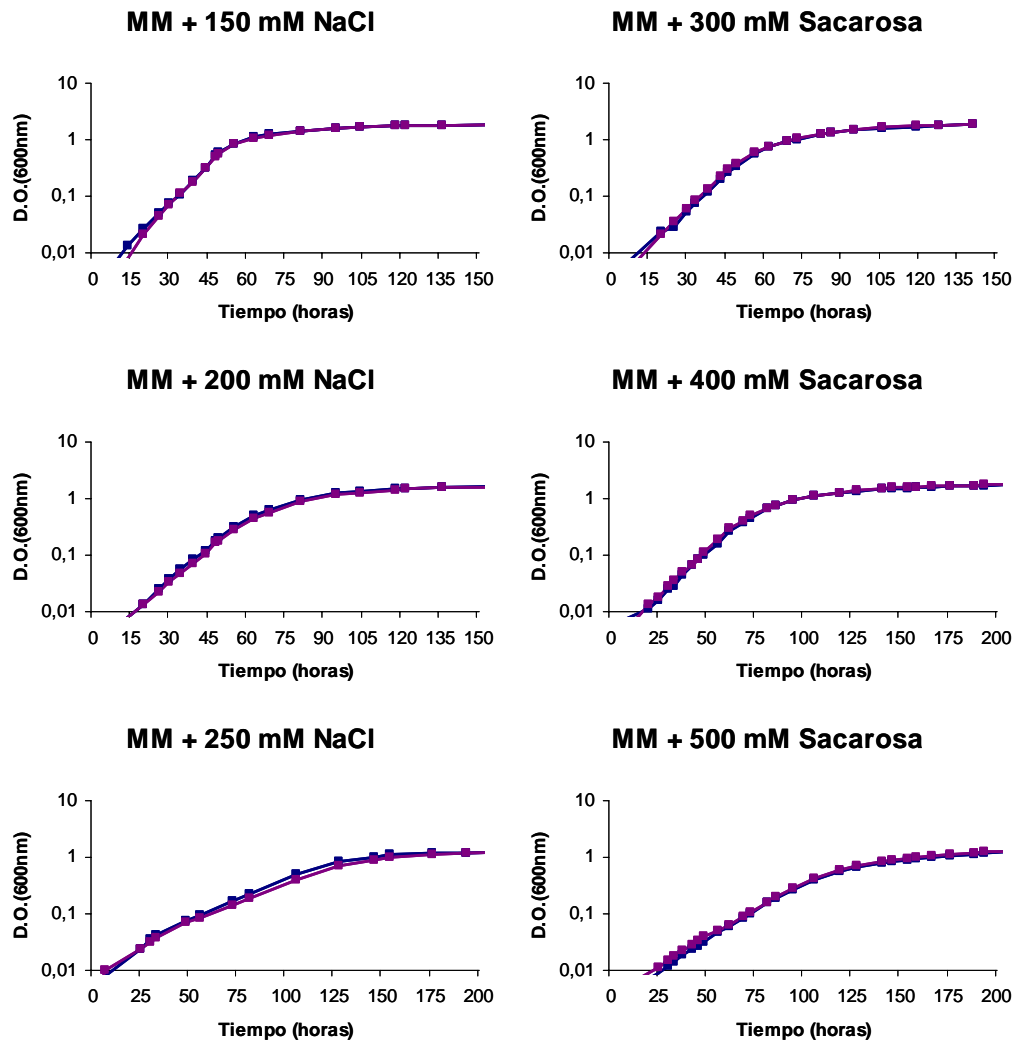


Figura R3.26.- Curvas de crecimiento de MOtSS (OtsA1⁻) en medio mínimo adicionado de distintas concentraciones de NaCl o sacarosa. En cada gráfica se incluye como control la curva de crecimiento de la cepa parental *M. loti* MAFF303099.

■ MAFF303099; ■ MOtSS.

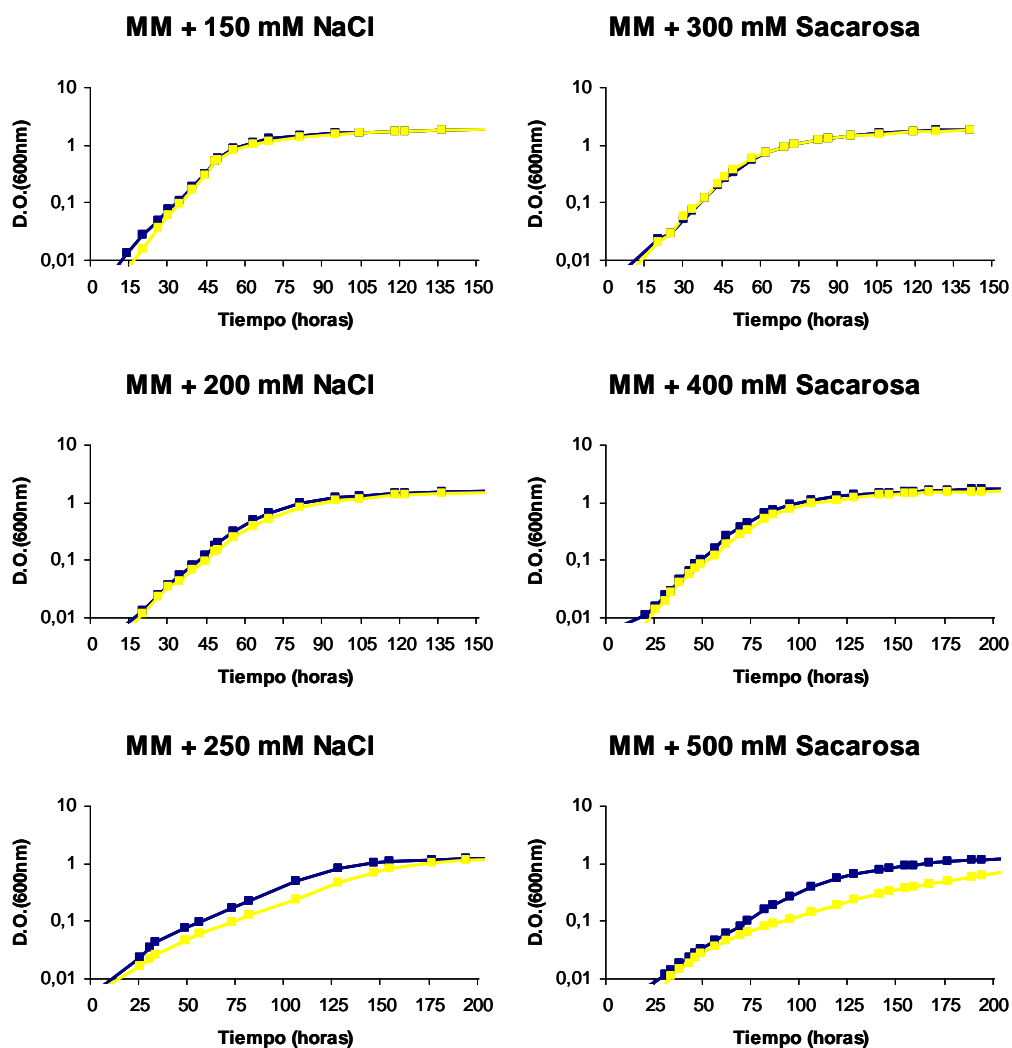


Figura R3.27.- Curvas de crecimiento de MOt2K (*OtsA2*) en medio mínimo adicionado de distintas concentraciones de NaCl o sacarosa. En cada gráfica se incluye como control la curva de crecimiento de la cepa parental *M. loti* MAFF303099.

■ MAFF303099; ■ MOt2K.

3.6.2. Crecimiento de los mutantes de *M. loti* MAFF303099 en medio sólido

La capacidad de osmoadaptación de los mutantes obtenidos se determinó también sobre placas de medio mínimo tamponado con una combinación de Tris y MES (5 mM) a pH 6, pH 6,5 o pH 7. En cada placa se compararon los dos mutantes con la cepa parental colocando gotas de 10 μ l de diluciones seriadas (desde unas 10^2 hasta 10^5 ufc) de tal modo que cada columna representaba una de las cepas ensayadas y cada fila, una

dilución. En todas las placas se incluyó la cepa parental, *M. loti* MAFF303099, como referencia y se utilizó como control el correspondiente medio sin NaCl o sacarosa añadidos (Fig. R3.28).

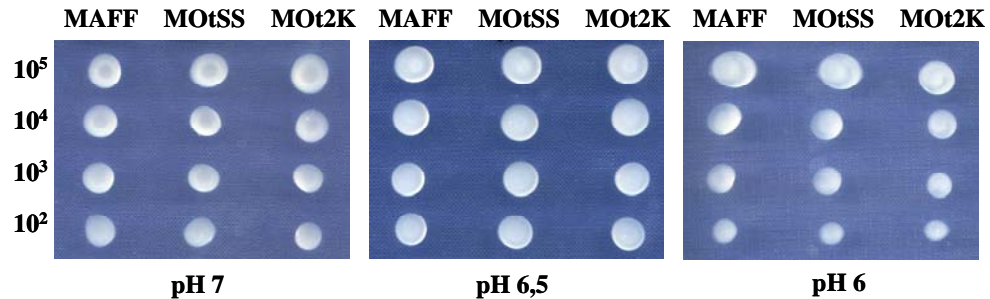


Figura R3.28.- Crecimiento en medio mínimo sólido al pH que se señala, de los mutantes de *M. loti* en genes de síntesis de trehalosa. Cada gota contiene aproximadamente el número de ufc indicado a la izquierda. Las columnas corresponden a la cepa que se indica en la parte superior de la imagen. **MAFF:** MAFF303099.

Para cada uno de los pHs utilizados se prepararon placas con 150 mM, 175 mM y 200 mM NaCl (Fig. R3.29), o 300 mM, 400 mM y 500 mM sacarosa (Fig. R3.30). *M. loti* mostró una mayor sensibilidad a NaCl en medio sólido de la que había presentado en medio líquido. Se encontró muy afectada por la adición de NaCl a bajo pH y su crecimiento se inhibió totalmente en presencia de 200 mM NaCl a pH 6. Además, fue incapaz de crecer en placas adicionadas de 250 mM NaCl a cualquier pH.

Los mutantes no presentaron diferencias en su capacidad de adaptación a ninguna de las concentraciones de NaCl ensayadas respecto a la cepa parental (Fig. R3.29), aunque como ya se ha indicado no fue posible ensayar aquellas concentraciones de NaCl que habían provocado diferencias en el comportamiento del mutante MOt2K en medio líquido (Fig. R3.27).

La adición de sacarosa tuvo también un efecto similar en medio sólido al observado en medio líquido. Se produjo una ligera inhibición del crecimiento de MOt2K como consecuencia de la presencia de 400 mM sacarosa y la diferencia de crecimiento con la cepa parental resultó evidente a 500 mM sacarosa a todos los pHs ensayados (Fig. R3.30).

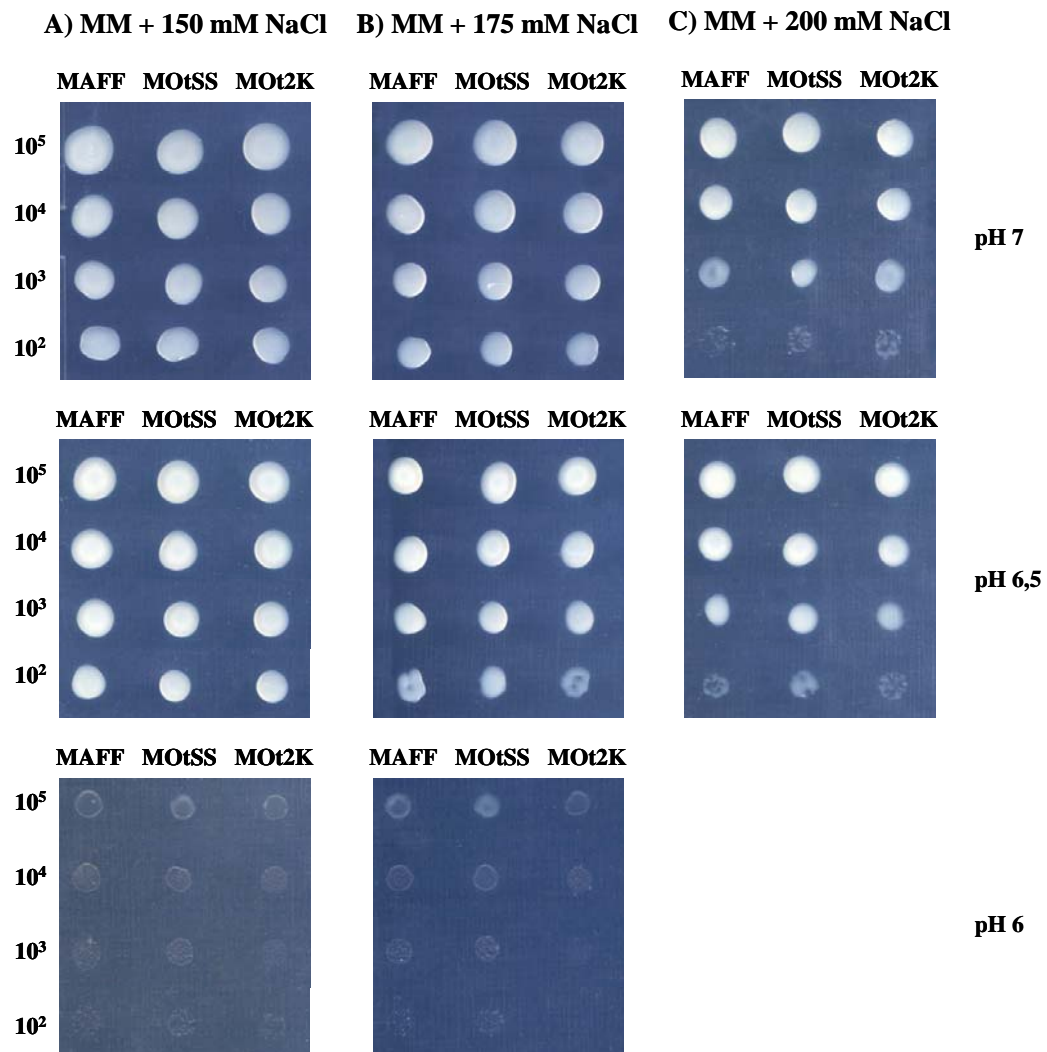


Figura R3.29.- Crecimiento en medio mínimo sólido adicionado de distintas concentraciones de NaCl al pH que se señala, de los mutantes de *M. loti* en genes de síntesis de trehalosa. Cada gota contiene aproximadamente el número de ufc indicado a la izquierda. Para cada placa, las columnas corresponden a la cepa que se señala en la parte superior de la imagen. **MAFF:** MAFF303099.

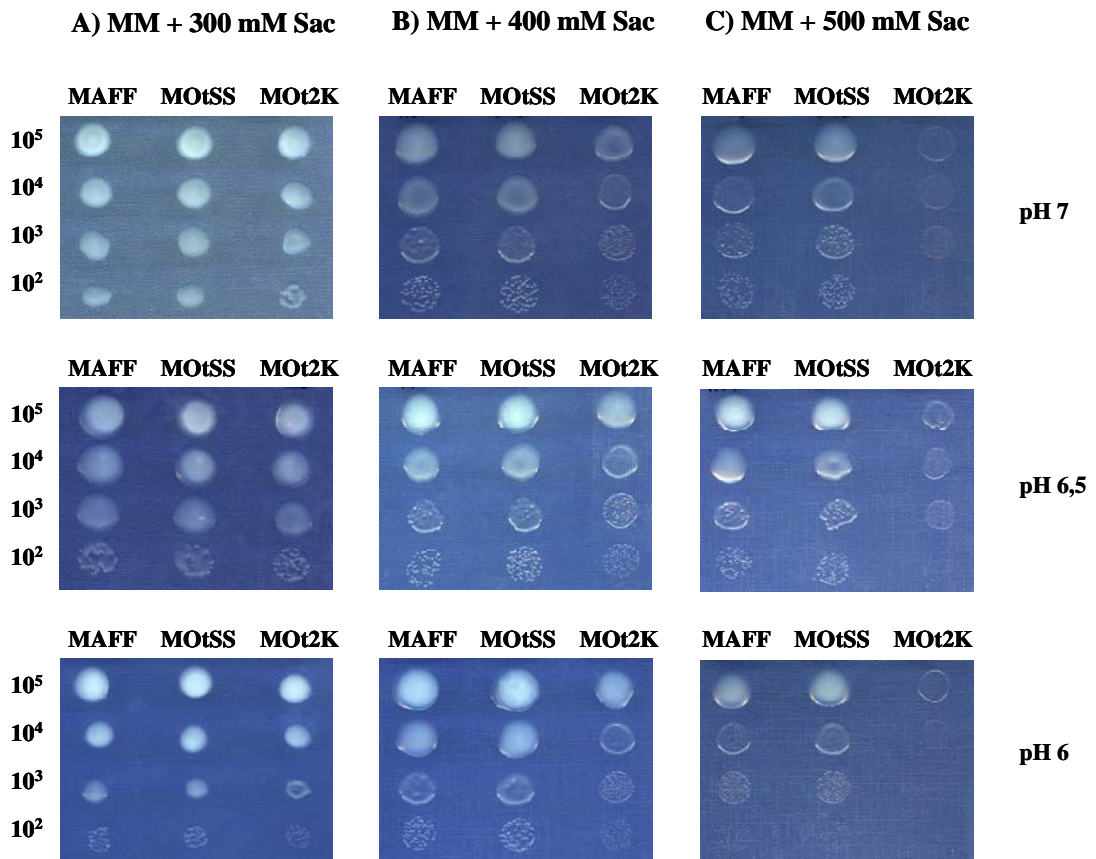


Figura R3.30.- Crecimiento en medio mínimo sólido adicionado de distintas concentraciones de sacarosa (Sac) al pH que se señala, de los mutantes de *M. loti* en sistemas de síntesis de trehalosa. Cada gota contiene aproximadamente el número de ufc indicado a la izquierda. Para cada placa, las columnas corresponden a la cepa señalada en la parte superior de la imagen. **MAFF:** MAFF303099.

3.7 Acumulación de trehalosa en los mutantes de *M. loti* MAFF303099

En estos estudios se determinó la cantidad de trehalosa acumulada por cada uno de los mutantes obtenidos tras un choque osmótico. Para ello, se dejaron crecer los cultivos hasta una $D.O_{600nm}$ de 0,4 y se adicionó NaCl hasta alcanzar una concentración de 250 mM. Estas condiciones de cultivo se mantuvieron 25-30 horas y a continuación se determinó la trehalosa acumulada por cada uno de los mutantes (Fig. R3.31).

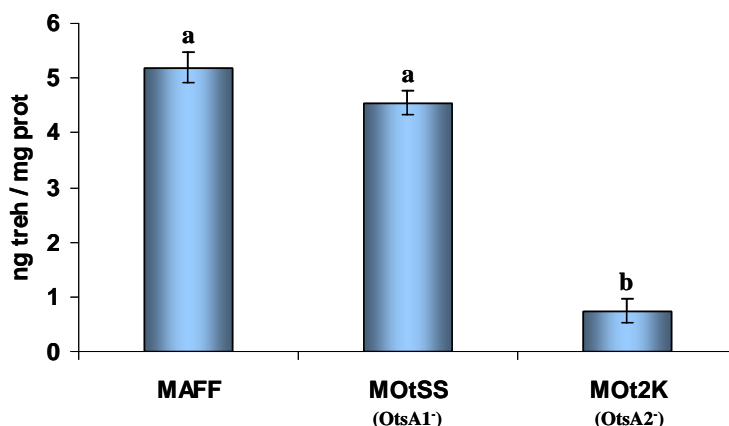


Figura R3.31.- Trehalosa acumulada en los mutantes de *M. loti* MAFF303099 en respuesta a la adición de 250 mM NaCl durante la fase de crecimiento exponencial. Índices distintos señalan diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ($P < 0,01$).

Podemos observar que el mutante MOtSS (OtsA1⁻) acumuló una cantidad de trehalosa semejante a la acumulada por *M. loti* MAFF303099, mientras que el mutante MOt2K (OtsA2⁻) presentó niveles mínimos de este compuesto en las condiciones ensayadas.

3.8 Comportamiento simbiótico de los mutantes de *M. loti* MAFF303099

Ambos mutantes en sistemas de síntesis de trehalosa de *M. loti* fueron capaces de formar nódulos fijadores de nitrógeno sobre raíces de *Lotus tenuis*. Para determinar la eficiencia simbiótica de estos mutantes, se utilizó un sistema de jarras Leonard. Las plantas se cosecharon 6 semanas después de la inoculación, se pesó la parte aérea, se contaron los nódulos formados y se determinó la actividad reductora de acetileno por nódulo (Fig. R3.32). El mutante MOtSS presentó en todos los casos un comportamiento similar al de la cepa parental MAFF303099, mientras que el mutante MOt2K formó un menor número de nódulos con una capacidad ligeramente disminuida de fijación de nitrógeno medida como actividad reductora de acetileno. Aunque dicha disminución no fue estadísticamente significativa cuando se determinó por nódulo, sí lo fue cuando se

determinó por planta (datos no mostrados), lo que se refleja en el menor peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas con este mutante.

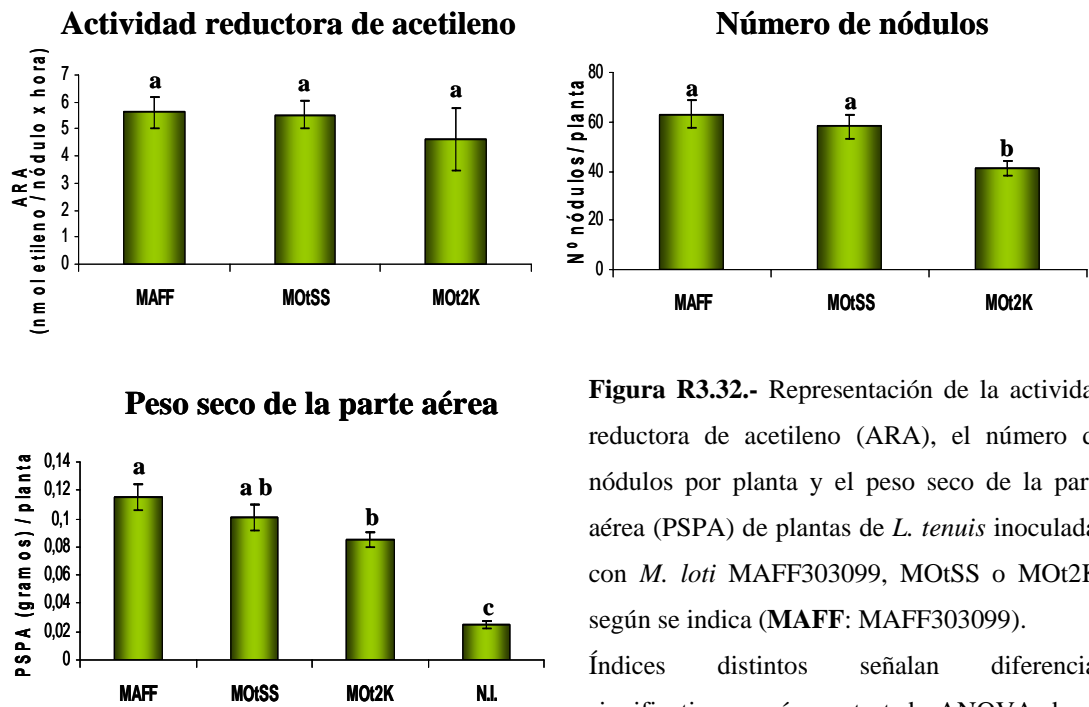


Figura R3.32.- Representación de la actividad reductora de acetileno (ARA), el número de nódulos por planta y el peso seco de la parte aérea (PSPA) de plantas de *L. tenuis* inoculadas con *M. loti* MAFF303099, MOtSS o MOt2K, según se indica (MAFF: MAFF303099).

Índices distintos señalan diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ($P < 0,05$).

Discusión: Capítulo 3

La trehalosa sirve a una gran variedad de propósitos en las células vivas. Puede actuar como fuente de carbono, como carbohidrato de reserva o como compuesto de protección frente a diversos estreses (Argüelles, 2000). Muchas especies bacterianas poseen una única ruta de biosíntesis; por ejemplo, *Escherichia coli* (Strøm y Kaasen, 1993) y *Salmonella enterica* (Howells *et al.*, 2002) sintetizan trehalosa utilizando la ruta OtsAB. En contraste, otras bacterias presentan las rutas OtsAB, TreYZ y TreS juntas, como ocurre en *Mycobacterium bovis*, *M. smegmatis* (De Smet *et al.*, 2000), *Corynebacterium glutamicum* (Tzvetkov *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2003), *Rhodobacter sphaeroides* (Makihara *et al.*, 2005) y *Bradyrhizobium japonicum* (Streeter y Gómez, 2006). Además, varias especies de eubacterias cuyos genomas han sido secuenciados parecen presentar más de una copia de genes que participan en alguna ruta de síntesis de trehalosa. Por ejemplo, *M. tuberculosis*, *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas campestris* tienen dos genes homólogos a *otsA* y *Thermoanaerobacter tengcongensis* presenta dos genes *treP* (Avonce *et al.*, 2006).

La presencia de varias rutas de biosíntesis de trehalosa parece una característica común entre los rizobios. Se pueden encontrar genes que probablemente codifican enzimas de las rutas OtsAB, TreYZ y TreS en el genoma de *Sinorhizobium medicae* (Copeland *et al.*, 2006), *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (Young *et al.*, 2006), *R. etli* CFN42 (González *et al.*, 2006), *S. meliloti* 1021 (Galibert *et al.*, 2001), *B. japonicum* USDA110 (Kaneko *et al.*, 2002), *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 y *Bradyrhizobium* sp. ORS278 (Giraud *et al.*, 2007). Se han identificado posibles genes *otsA*, *otsB* y *treY* en la secuencia parcial del genoma de *Rhizobium* sp. NGR234 (Freiberg *et al.*, 1997; Streit *et al.*, 2004) y algunos datos indican la posible multiplicidad génica para la ruta OtsAB en *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (Kaneko *et al.*, 2000). Además, las rutas TreYZ, OtsAB y TreS se han detectado mediante ensayos enzimáticos en *B. japonicum* y *B. elkanii* (Streeter y Gómez, 2006). Sin embargo, sólo la OtsAB se detectó en *S. meliloti* y sólo la TreYZ se detectó en *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Streeter y Gómez, 2006). A pesar de ello, se ha visto que las rutas OtsAB y TreYZ son activas y aparentemente redundantes en *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Mc Intyre *et al.*, 2007) y nosotros hemos observado que el estrés osmótico

induce genes implicados en las tres rutas de síntesis de trehalosa en *S. meliloti* (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2006), lo que parece indicar que estos genes son activos y presentan funciones relacionadas con la adaptación a estrés.

En este trabajo se describe la obtención de mutantes inactivados en cada una de las rutas biosintéticas de trehalosa presentes en los genomas de *S. meliloti* 1021 y *M. loti* MAFF303099. En *S. meliloti* se obtuvieron además mutantes en los que se inactivaron simultáneamente varias rutas de síntesis de trehalosa.

En los estudios sobre la capacidad de crecimiento en diversas condiciones de estrés se observó que un mutante en el gen *otsA1* de *M. loti* no presentó diferencias respecto a la cepa parental en ninguna de las condiciones probadas. Tampoco se observaron diferencias en el comportamiento de este mutante en ninguno de los demás experimentos realizados lo que, junto con el análisis de la secuencia del gen *otsA1*, nos lleva a considerar que se trata de una copia truncada de *otsA* que no es funcional. En consecuencia, la situación en *M. loti* es una excepción entre los rizobios ya que sólo posee una ruta de síntesis de trehalosa. El mutante MOt2K que carece de esta ruta, presentó dificultades de crecimiento en medios con elevadas concentraciones de NaCl o sacarosa y fue incapaz de acumular trehalosa durante la adaptación a un choque hiperosmótico.

En *S. meliloti* se observó que la carencia de OtsA o TreS condujo a la aparición de problemas de crecimiento en medio sólido a elevadas concentraciones de NaCl o sacarosa. Dichas dificultades fueron mayores en el mutante OtsA⁻ que en el TreS⁻, se intensificaron en el doble mutante 10trOt (OtsA⁻, TreS⁻) y resultaron aún más acusadas en un mutante triple, lo que indica que los tres sistemas de síntesis de trehalosa se encuentran implicados en la adaptación a estrés osmótico, aunque no todos ellos son igual de relevantes para este proceso. Parece que OtsA es el más importante de los tres, seguido por TreS y después por TreY, cuya ausencia sólo provocó un fenotipo en mutantes que carecían de los otros dos sistemas de síntesis descritos. Los fenotipos observados fueron más intensos a pH ácido para la misma concentración del compuesto estresante utilizado, lo que indica un cierto solapamiento en las respuestas a estrés osmótico y bajo pH. Se sabe desde hace tiempo que el estrés ácido origina protección

cruzada frente a otros tipos de estrés como el osmótico o el térmico (Leyer y Johnson, 1993). Además se ha observado que la respuesta a condiciones de acidez puede presentar un solapamiento tanto transcriptómico como proteómico con la respuesta a estrés osmótico (Svensäter *et al.*, 2000; Martín-Galiano *et al.*, 2005). Un fenómeno semejante podría explicar el efecto aditivo que se observa durante la aplicación simultánea de ambos tipos de estrés en nuestros experimentos.

Tanto en *S. meliloti* como en *M. loti* las diferencias descritas en el crecimiento de mutantes en sistemas de síntesis de trehalosa sólo fueron apreciables a concentraciones muy elevadas de los solutos correspondientes, lo que puede relacionarse con la acumulación de otros compuestos osmoprotectores durante la fase de crecimiento exponencial. Smith y colaboradores (1994b) ya propusieron que en *S. meliloti* la trehalosa actúa en condiciones severas de estrés osmótico, mientras que en condiciones menos desfavorables la acumulación de glutamato o NAGGN es superior a la de trehalosa.

Cuando se añade al medio de cultivo algún compuesto identificado como osmoprotector no acumulado en *S. meliloti*, la bacteria lo capta a través de sistemas de transporte específicos y parece catabolizarlo ya que no lo acumula. Los osmoprotectores no acumulados pueden tener un gran interés en el caso de los rizobios porque muchos de estos compuestos se encuentran presentes en el suelo y la rizosfera. Por ejemplo, la sacarosa es un producto de la fotosíntesis y es abundante en los exudados radiculares (Miller y Wood, 1996; Phillips y Streit, 1997). Además, se sabe que los genes que codifican el transportador implicado en la captación de ectoína se expresan en el nódulo, lo que sugiere que puede haber sustratos específicos producidos por la planta que también podrían actuar durante la simbiosis como osmoprotectores no acumulados (Jebbar *et al.*, 2005).

Los resultados que se presentan en este trabajo indican que la adición de pequeñas cantidades de un osmoprotector no acumulado, como es la trehalosa, al medio tiene un efecto osmoprotector también sobre un mutante en los tres sistemas de síntesis de trehalosa conocidos. Estos resultados están en consonancia con estudios previos que relacionan el efecto osmoprotector de estas sustancias con un aumento de los niveles de

glutamato y NAGGN pero no de trehalosa durante la fase de crecimiento exponencial (Gouffi *et al.*, 1999). Sin embargo, parece que incluso en presencia de concentraciones osmoprotectoras de trehalosa en el medio, la síntesis endógena de este compuesto sigue siendo importante para la adaptación a elevadas concentraciones de solutos como indica el hecho de que el triple mutante presente una capacidad de crecimiento disminuida respecto a la cepa parental.

Los estudios de expresión que se llevaron a cabo con los genes *otsA* y *treY* de *S. meliloti* revelaron una clara inducción en respuesta a estrés osmótico que fue dependiente de dosis y resultó especialmente patente ante un incremento súbito de la osmolaridad del medio. A pesar de no tener datos sobre la expresión del gen *treS* en respuesta a estrés osmótico, el hecho de que este gen, junto con otros cinco genes con los que probablemente forma un operón se encuentre entre los considerados como genes inducidos en los experimentos de microarrays que se describen en el capítulo 1, nos permite suponer que se induce en respuesta a un choque osmótico de modo semejante a lo observado para los genes *otsA* y *treY*.

Se ha descrito que la acumulación de trehalosa en respuesta a estrés osmótico alcanza sus máximos niveles al final de la fase de crecimiento exponencial y principio de la fase estacionaria en *S. meliloti* (Talibart *et al.*, 1997) y nuestros resultados indican que en condiciones no estresantes la trehalosa se acumula hasta alcanzar niveles máximos durante la fase estacionaria tardía. Sin embargo, estas observaciones no se corresponden con ningún cambio en la expresión de los genes *otsA* y *treY* ya que no están sujetos a regulación transcripcional según la fase de crecimiento sea cual sea la osmolaridad del medio. No puede descartarse que la acumulación de trehalosa observada se deba a un aumento de la expresión de *treS* aunque también podría ser debida a causas no relacionadas con la expresión génica. En *R. leguminosarum* bv. *trifolii* se ha observado que la expresión de *treY* y *otsA* es constitutiva a lo largo de la curva de crecimiento, pero se produce una acumulación de trehalosa durante la entrada en fase estacionaria (McIntyre *et al.*, 2007). Los autores relacionan este hecho con una regulación posttranscripcional de estos sistemas, aunque no estudian la posible implicación de un sistema TreS en el proceso.

La acumulación de trehalosa que se produce en *S. meliloti* 1021 como respuesta a un choque osmótico es máxima a concentraciones de NaCl inferiores a las que inducen los niveles más altos de expresión de los genes *otsA* y *treY* y disminuye cuando se utilizan concentraciones más elevadas. Este hecho, aunque inesperado, puede reflejar un compromiso del metabolismo celular en respuesta a condiciones de estrés muy severas.

Se sabe que la acumulación de trehalosa puede encontrarse controlada por procesos posttranscripcionales en otras bacterias. Por ejemplo, en *C. glutamicum* se ha estudiado la respuesta a estrés osmótico de los genes de sistemas de síntesis de trehalosa y se sabe que la expresión de *otsA* y *treS* aumenta significativamente tras un choque osmótico, mientras que la de *treY* se mantiene prácticamente constante a pesar de que en esta bacteria la síntesis osmorregulada de trehalosa es principalmente dependiente del sistema TreYZ (Wolf *et al.*, 2003). De modo similar, es posible que en *S. meliloti* la expresión génica no se relacione con la actuación de los distintos sistemas de síntesis de trehalosa durante la adaptación a estrés osmótico. A pesar de ello, resulta poco probable que la inducción de la expresión de todos los genes implicados en la síntesis de trehalosa en *S. meliloti* como respuesta a estrés osmótico observada y el hecho de que dicha inducción parezca ser dependiente de dosis sean meras casualidades. Es importante señalar que se han apreciado diferencias significativas tanto en los niveles de expresión de los sistemas estudiados, como en su patrón de respuesta a lo largo del tiempo, y cabe subrayar que la transcripción de *otsA* es mayor que la de *treY* y que su respuesta a un estrés osmótico es más rápida y más intensa, lo que podría relacionarse con la particular implicación de este sistema en la acumulación de trehalosa en respuesta a un choque osmótico y con su mayor relevancia para la osmoadaptación de la bacteria. Es posible que el aumento observado de la expresión de los genes *otsA* y *treY* se deba a la incapacidad de los sistemas de síntesis presentes en la célula para mantener la concentración necesaria de trehalosa ante un estrés de gran intensidad o bien a que otros mecanismos de adaptación a estrés se vean igualmente comprometidos obligando a una activación de la expresión génica. La regulación de la actividad de las rutas de síntesis o catabolismo de la trehalosa presentes en la célula puede ser responsable de la

acumulación de este compuesto tras un choque osmótico menos pronunciado que haría innecesaria la inducción génica.

El sistema OtsA es esencial para la acumulación de trehalosa en *S. meliloti* en respuesta a un choque osmótico. Aunque se ha podido observar la implicación del sistema TreY y no se puede descartar una posible participación de TreS en este proceso, la carencia de un sistema OtsA activo es suficiente para conducir a la acumulación de niveles mínimos de trehalosa en los distintos mutantes. Es posible que la sensibilidad del método utilizado para la determinación de trehalosa sea insuficiente para permitirnos apreciar pequeñas variaciones en la acumulación de este compuesto por los mutantes dobles o el triple, y que dichas variaciones tengan un efecto fisiológico sobre la capacidad de adaptación de la bacteria a estrés osmótico. Sin embargo, también existe la posibilidad de que los sistemas TreS o TreY ejerzan su efecto osmoprotector a través de mecanismos que no impliquen la acumulación de trehalosa, tal y como se ha observado por ejemplo en el caso del efecto osmoprotector ejercido por la presencia de pequeñas cantidades de trehalosa exógena (Gouffi *et al.*, 1999).

Todos los mutantes obtenidos en sistemas de síntesis de trehalosa fueron capaces de nodular y fijar nitrógeno y sólo en el caso del sistema OtsA2 de *M. loti* se observó una disminución en la capacidad infectiva del mutante respecto a la de la cepa parental. Este mutante dio lugar a la formación de un número de nódulos menor que la cepa parental en simbiosis con *L. tenuis* y el peso seco de la parte aérea de plantas inoculadas con la cepa mutante fue también inferior que el de plantas inoculadas con *M. loti* MAFF303099. Este es un fenotipo muy distinto del observado en *S. meliloti* pero semejante al descrito para un mutante en el gen *otsA* de *R. etli* (Orozco *et al.*, 2006), por lo que parece que la implicación de la síntesis de trehalosa en el proceso simbiótico puede ser muy diferente según el organismo estudiado.

En *S. meliloti* se pudo apreciar que el triple mutante presentó una menor competitividad en la formación de nódulos que la cepa parental. Estas observaciones son consistentes con estudios previos llevados a cabo en *R. leguminosarum* bv. *trifolii* en los que se muestra que la acumulación de trehalosa por esta bacteria no fue necesaria para la nodulación y la fijación de nitrógeno, pero que un mutante incapaz de sintetizar

este compuesto fue menos competitivo que la cepa parental (McIntyre *et al.*, 2007). También se sabe que los mutantes de *S. meliloti* incapaces de utilizar trehalosa son más competitivos que su cepa parental aunque la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno no se encuentran afectadas (Jensen *et al.*, 2005). Estos autores consideran que el fenotipo observado puede deberse a que una posible acumulación de trehalosa ocasionada por la incapacidad catabólica de la cepa conduciría a un aumento de la tolerancia de la bacteria frente a distintos estreses con los que puede encontrarse durante el establecimiento de la simbiosis. Según esto, la acumulación de trehalosa en *R. leguminosarum* bv. trifolii o *S. meliloti* puede tener una función en la tolerancia a estrés de la bacteria durante la nodulación. Además, se ha visto que los mutantes en sistemas de captación de trehalosa de *S. meliloti* no se encuentran afectados en su capacidad para colonizar las raíces pero sí en su capacidad para competir con la cepa silvestre durante la colonización (Jensen *et al.*, 2002). Este hecho se relaciona con la presencia de trehalosa en los exudados radicales y su utilización como fuente de carbono y energía por parte de la bacteria. Sin embargo, es importante recordar que la trehalosa puede ejercer un efecto como osmoprotector no acumulado y que para ello debe ser transportada al citoplasma celular, por lo que la menor competitividad de los mutantes en sistemas de transporte de trehalosa también podría deberse a una disminución de su capacidad para enfrentarse a un posible estrés osmótico durante el proceso de colonización de la raíz.

Se ha observado con anterioridad que mutantes con una menor capacidad de adaptación a estrés osmótico presentan también menor competitividad que la cepa parental o bien una disminución en su infectividad o su efectividad en la fijación simbiótica de nitrógeno (Nogales *et al.*, 2002; Miller-Williams *et al.*, 2006). En nuestro caso, el triple mutante de *S. meliloti* en sistemas de síntesis de trehalosa presentó además de una menor competitividad que la cepa parental, una menor eficiencia en la fijación simbiótica de nitrógeno medida como actividad reductora de acetileno, lo que puede indicar que la capacidad de síntesis de trehalosa es importante para el buen funcionamiento de la simbiosis entre *S. meliloti* y *Medicago sativa*. Sin embargo, resulta curioso que esta menor actividad no se refleje en una disminución del peso seco de la

parte aérea de la planta. Podría relacionarse este hecho con un ligero aumento del número de nódulos formados por el mutante en estas condiciones respecto a la cepa parental, aunque dicho aumento no llegó a ser estadísticamente significativo y la actividad reductora de acetileno por planta siguió siendo claramente inferior en el mutante (datos no mostrados).

En la literatura se suele relacionar la presencia de trehalosa en el nódulo con condiciones de estrés osmótico o con procesos de senescencia nodular. Se ha visto que el contenido de trehalosa aumenta en nódulos en respuesta a NaCl en *M. sativa* (más de cuatro veces, Fougère *et al.*, 1991), en *Phaseolus vulgaris* (más de dos veces, Farías-Rodríguez *et al.*, 1998) y en *Glycine max* (Müller *et al.*, 1996). También se sabe que un aumento del contenido de trehalosa en nódulos de *Lotus japonicus* provocado por la aplicación de Validamicina, protege a la planta en condiciones de salinidad (López *et al.*, 2006).

En nuestro caso resulta sorprendente el hecho de que la imposición de condiciones de estrés osmótico no sólo no provoque una acentuación del fenotipo del mutante sino que por el contrario parezca aliviar los efectos de la mutación. Este hecho podría explicarse por la puesta en marcha de otros mecanismos de respuesta a estrés osmótico en estas condiciones. Por ejemplo, se sabe que la disponibilidad de cantidades sustanciales de prolina betaína sintetizada por la planta puede aliviar directa o indirectamente los efectos negativos del estrés salino en la fijación de nitrógeno (Boscari *et al.*, 2006). El gen *betS*, que codifica el principal transportador de prolina betaína, se expresa a lo largo de las distintas etapas de la interacción simbiótica y se induce en respuesta a estrés osmótico. La mutación de *betS* no tiene un efecto significativo sobre la nodulación y la fijación de nitrógeno, mientras que su sobreexpresión favorece el mantenimiento de la actividad fijadora de nitrógeno durante las fases iniciales de la adaptación a estrés osmótico en la planta (Boscari *et al.*, 2006). Según esta hipótesis, el estrés osmótico provocaría la inducción de este tipo de mecanismos que en condiciones normales no serían activos y podrían proteger a la bacteria permitiendo una mayor tasa de fijación de nitrógeno en condiciones estresantes. En este caso, es necesario asumir que la adaptación a estrés osmótico en el bacteroide

difiere de la adaptación en vida libre ya que hemos podido constatar que durante el crecimiento en vida libre, la producción de trehalosa sólo es importante para el proceso de osmoadaptación en condiciones mucho más severas que las necesarias para la inducción de otros sistemas como el BetS (Boscari *et al.*, 2006). En cambio, la adaptación al ambiente nodular dependería inicialmente de la síntesis de trehalosa y sólo ante la aplicación de un estrés, se produciría inducción de otros sistemas osmoprotectores. Lo cierto es que sí se ha visto una variación en la regulación de los sistemas de síntesis de trehalosa entre la adaptación a estrés hiperosmótico en vida libre y en simbiosis, de modo que según las condiciones estudiadas la importancia relativa de los distintos sistemas de síntesis puede variar (Streeter y Gómez, 2006). Además, se sabe que la síntesis de trehalosa se induce en condiciones de microaerobiosis, por lo que es posible que la relevancia de estos sistemas en la adaptación al ambiente nodular sea superior a lo observado durante la adaptación a estrés osmótico en vida libre. Sin embargo, esta hipótesis no explica el hecho de que las plantas inoculadas con el triple mutante de *S. meliloti* no presenten en ningún caso diferencias significativas de su peso respecto a plantas inoculadas con la cepa parental, a pesar de las diferencias observadas en la tasa de fijación de nitrógeno.

El segundo proceso con el que se suele relacionar la presencia de trehalosa en el nódulo es con la senescencia. Se ha observado que los niveles de trehalosa se mantienen en nódulos durante la senescencia mientras decae la concentración de otros azúcares junto con la actividad nitrogenasa. Así, al cabo de unos días, la trehalosa pasa a ser el azúcar no estructural predominante en el nódulo (Müller *et al.*, 2001). Este aumento de la concentración relativa de trehalosa en los nódulos senescentes se ha presentado como la explicación al mantenimiento del número de bacterias viables aisladas de los nódulos durante el proceso de senescencia (Müller *et al.*, 1994), ya que la trehalosa puede proteger a estas células de daños en la membrana o actuar como reserva de energía. La incapacidad para sintetizar trehalosa por parte de la bacteria podría provocar un acortamiento generalizado de la vida útil de los nódulos induciendo una senescencia temprana. La baja actividad reductora de acetileno que hemos podido observar podría explicarse si el estudio se realizó en un momento en el que los nódulos formados por la

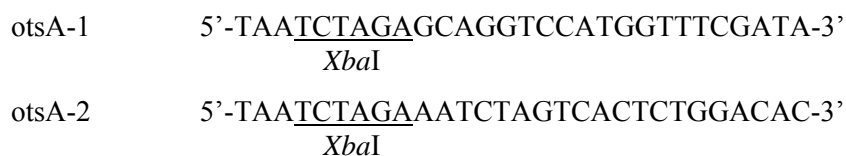
cepa parental eran aún plenamente funcionales mientras que los formados por el triple mutante se encontraban ya en una etapa de senescencia. Es entonces posible que durante la vida útil de estos nódulos, la fijación de nitrógeno por parte del mutante no sea distinta de la desarrollada por la cepa parental, lo que además explica que el peso de la parte aérea de las plantas sea semejante. De nuevo es necesario asumir que la aplicación de un estrés exógeno provocaría la inducción de sistemas capaces de proteger a la bacteria. Esta protección retrasaría el proceso de senescencia de tal modo que en presencia de NaCl las plantas inoculadas con la cepa mutante presentaron una actividad reductora de acetileno igual a la de la cepa parental. En vida libre se ha observado que los mecanismos de respuesta a estrés osmótico pueden actuar también durante la adaptación a otros tipos de estrés como puede ser el estrés oxidativo. De hecho, se ha observado que la sobreexpresión del gen *otsA* en *R. etli* induce tolerancia no sólo frente a estrés osmótico sino también frente al estrés por altas y bajas temperaturas (Suárez *et al.*, 2007). Además, se sabe que la exposición a condiciones de elevada osmolaridad puede conferir una resistencia cruzada ante otras condiciones adversas como puede ser el estrés por elevadas temperaturas (Wood *et al.*, 2001).

Anexos: Capítulo 3

Anexo 3.1. Construcción de mutantes en sistemas de síntesis de trehalosa de *S. meliloti* 1021

Anexo 3.1.1. Construcción de un mutante en el gen *otsA* de *S. meliloti* 1021

Para la construcción de este mutante se amplificó, a partir del ADN genómico de la cepa parental *S. meliloti* 1021, un fragmento de 3.075 pb que contenía el gen *SMa0233*, anotado como *otsA*, mediante el uso de los cebadores:



El producto de PCR generado (representado en la figura A3.1) se clonó en el sitio *Sma*I del vector de clonación pBSKS(+) dando lugar al plásmido pBSOt-10. Posteriormente, un fragmento *Mlu*I de 900 pb que incluía el promotor y la primera mitad del gen *otsA*, se sustituyó por un cassette de resistencia a Sm/Spc que se obtuvo a partir del vector pHP45Ω, digiriendo *Sma*I y purificando la banda correspondiente. De este modo se construyó el plásmido pBSOtSS, a partir del cual se recuperó el inserto utilizando los sitios *Xba*I incluidos en los cebadores utilizados para la amplificación. El fragmento de ADN aislado se clonó en el vector pK18*mobsacB* y la nueva construcción se denominó pKOtSS. Dicha construcción se movilizó hasta la cepa 1021 de *S. meliloti* para obtener el mutante llamado 10OtSS. Al tratarse de un vector suicida, este plásmido no puede replicarse en el fondo genético de *Rhizobium*, propiedad que permite seleccionar transconjugantes resistentes a Sm/Spc y sensibles a Km, en los que se habrá producido el correspondiente intercambio alélico. La selección por resistencia a sacarosa que permitiría el uso del plásmido pK18*mobsacB* no se utilizó durante la obtención de estos mutantes ya que podrían presentar un fenotipo de sensibilidad a medios hiperosmóticos que afectase su crecimiento en estas condiciones. En la figura A3.1 se muestra de modo esquemático el fragmento amplificado de 3.075 pb por PCR y la mutación resultante. La mutación se verificó en cuatro transconjugantes, mediante

hibridación de su ADN genómico digerido con *EcoRI* y utilizando como sonda el fragmento amplificado marcado con digoxigenina (Fig. A3.2). Como podemos observar en la figura A3.1, la deleción del fragmento *MluI* provoca la pérdida de un sitio *EcoRI*. Esto da lugar a que dos fragmentos *EcoRI* de 5.081 pb y 5.043 pb presentes en la cepa parental *S. meliloti* 1021 se conviertan en un fragmento de más de 11 Kb en los mutantes *S. meliloti* 10OtSS.

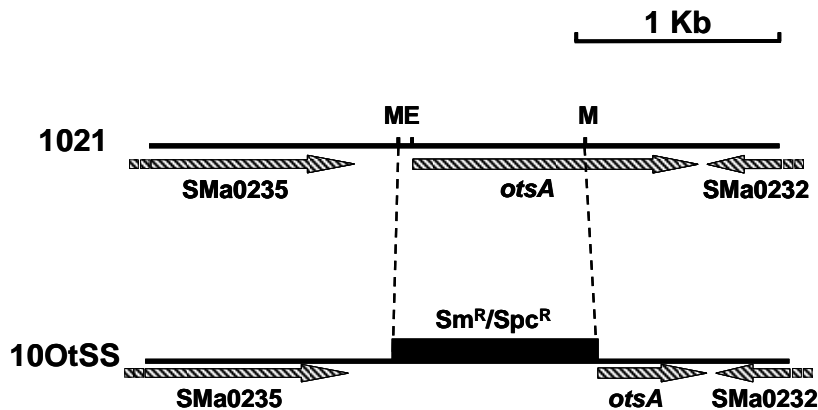


Figura A3.1.- Representación esquemática del fragmento amplificado para la construcción del mutante 10OtSS mediante deleción e inserción de un cassette de resistencia a Sm/Spc.
M: *MluI*; **E:** *EcoRI*.

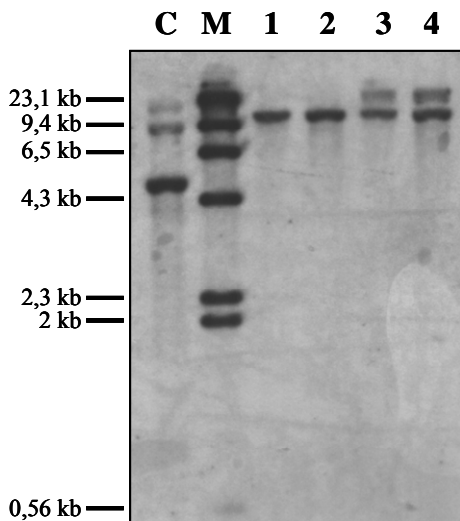


Figura A3.2.- Comprobación de mutantes 10OtSS de *S. meliloti* mediante hibridación del ADN genómico digerido con *EcoRI* y usando como sonda el amplificado de la región.
 Carriles: C, cepa parental (1021); M, Marcador de peso molecular marcado con digoxigenina; 1-4, mutantes OtsA⁻ de *S. meliloti* 1021.

Anexo 3.1.2. Construcción de un mutante en el gen *treY* de *S. meliloti* 1021

Para la construcción de este mutante se amplificó, a partir del ADN genómico de la cepa parental *S. meliloti* 1021, un fragmento de 3.212 pb (Fig. A3.3) que contenía el gen SMb20574 que codifica una posible maltooligosil trehalosa sintasa, mediante el uso de los cebadores:

MOT-1 5'-TAAGGATCCGTCGAAGACGTGCTTGAAGA-3'

MOT-2 5'-TAAGGTACCACGCTCGAATGGCTGATCCT-3'

El producto de PCR generado se clonó en el vector pGEM[®]-T Easy dando lugar al plásmido pGEMOT. Posteriormente, un fragmento *Sma*I de 221 pb que se encontraba en la zona central del supuesto gen *treY*, se sustituyó por un cassette de resistencia a Km que se obtuvo a partir del vector pHP45ΩKm, digiriendo *Hind*III, haciendo extremos romos y purificando la banda correspondiente. De este modo se obtuvo la construcción pGMotK que se utilizó para recuperar la mayor parte del inserto mediante una digestión *Eco*RV. El fragmento de ADN aislado se clonó en el vector pSUP202Pol4 y la nueva construcción se denominó pSMotK. Dicha construcción se movilizó hasta la cepa 1021 de *S. meliloti* para obtener el mutante llamado 10MOTK. Al tratarse de un vector suicida, este plásmido no puede replicarse en el fondo genético de *Rhizobium*, propiedad que permite seleccionar transconjugantes resistentes a Km y sensibles a Tc, en los que se habrá producido el correspondiente intercambio alélico. En la figura A3.3 se muestra un esquema del fragmento amplificado de 3.212 pb y la mutación resultante. La mutación se verificó en cuatro transconjugantes, mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *Hind*III y utilizando como sonda el fragmento amplificado marcado con digoxigenina (Fig. A3.4). Esta sonda hibrida con dos fragmentos *Hind*III del genoma de *S. meliloti* 1021, de 1.868 pb y 2.136 pb de tamaño. La inserción del cassette en el mutante es interna al fragmento *Hind*III de 1.868 pb, por lo que en las cepas mutantes, la banda correspondiente es sustituida por otra de unas 3,7 Kb.

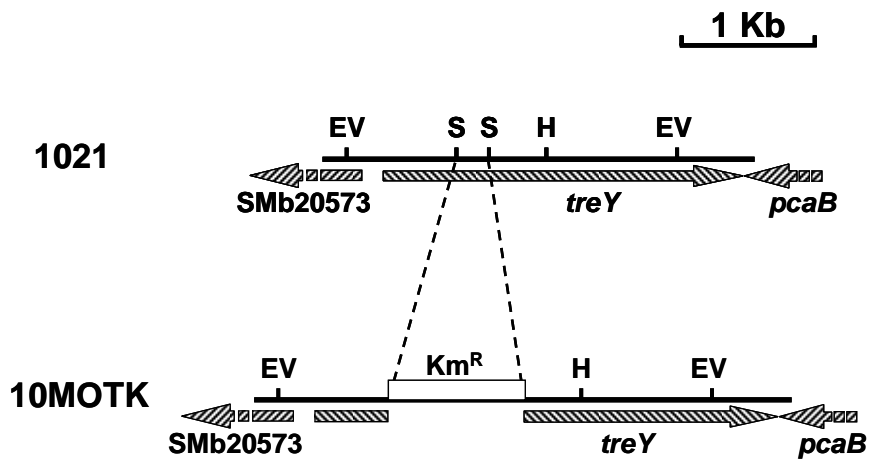


Figura A3.3.- Representación esquemática de la construcción del mutante 10MOTK mediante delección e inserción de un cassette de resistencia a Km.
 EV: *EcoRV*; S: *SmaI*; H: *HindIII*

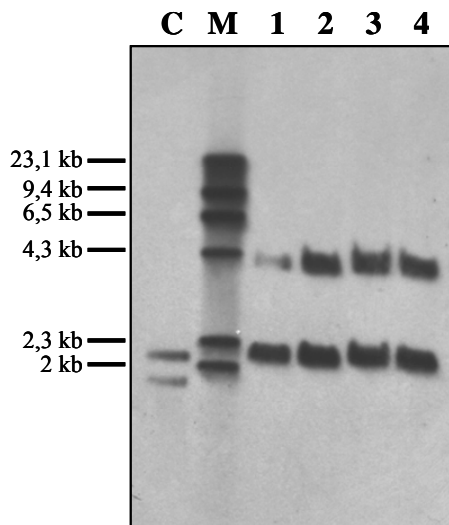


Figura A3.4.- Comprobación de mutantes 10MOTK de *S. meliloti* mediante hibridación del ADN genómico digerido con *HindIII* y usando como sonda el amplificado de la región.
 Carriles: C, cepa parental (1021); M, Marcador de peso molecular marcado con digoxigenina; 1-4, mutantes TreY⁻ de *S. meliloti* 1021.

Anexo 3.1.3. Construcción de un mutante en el gen *treS* de *S. meliloti* 1021

Para la construcción de este mutante se amplificó, a partir del ADN genómico de la cepa parental *S. meliloti* 1021, un fragmento de 3.244 pb (Fig. A3.5) que contenía el gen SMb20099, que codifica una posible trehalosa sintasa, mediante el uso de los cebadores:

treS-1 5'-TAATCTAGACGTCTGCTTTTTTCGCTACAT-3'
treS-2 5'-TAATCTAGACCGACATTGTGGAGGTAGAT-3'

El producto de PCR generado se clonó en pGEM[®]-T Easy dando lugar al plásmido pGtreS. Posteriormente, se aisló un fragmento *XhoI-SmaI* interno al gen de 1.077 pb y se clonó en el vector pSUP202Pol4. El plásmido resultante se denominó pStreS-1Kb y se utilizó para la obtención del mutante 10treS mediante simple integración de la construcción completa en el gen *treS* de *S. meliloti* 1021 seleccionando colonias resistentes a Tc. En la figura A3.5 se muestra un esquema del fragmento amplificado y la mutación resultante. La mutación se verificó en seis transconjugantes, mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *EcoRI* y utilizando como sonda el fragmento amplificado de 3.244 pb marcado con digoxigenina (Fig. A3.6). Esta sonda hibrida con un fragmento *EcoRI* de 2.871 pb y marca también una pequeña región de otro fragmento de 1.794 pb. Debido a la inserción del pSUP202Pol4, que contiene un sitio *EcoRI*, en la región central del gen *treS*, la banda correspondiente al fragmento de 2.871 pb es sustituida por dos bandas de 2,5 y 8,1 Kb.

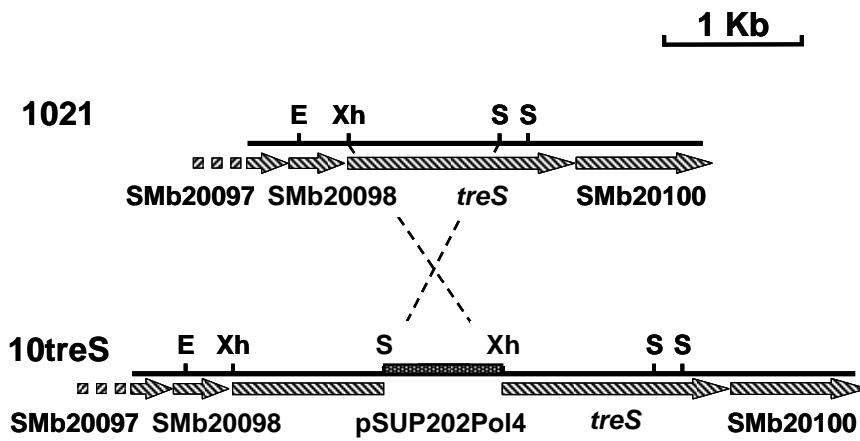


Figura A3.5.- Representación esquemática de la construcción del mutante 10treS mediante integración del vector pSUP202Pol4.
 Xh: *XhoI*; S: *SmaI*; E: *EcoRI*

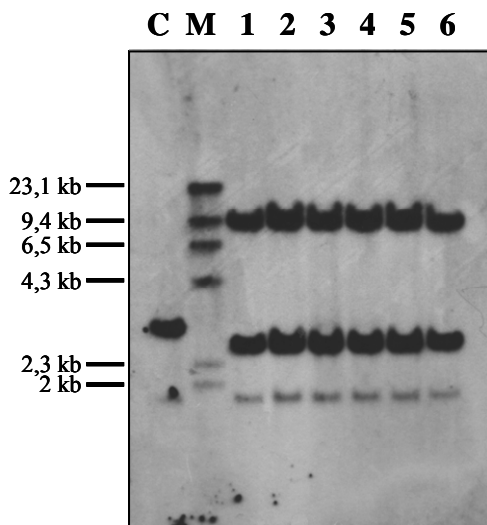


Figura A3.6.- Comprobación de mutantes 10treS de *S. meliloti* mediante hibridación del ADN genómico digerido con *EcoRI* y usando como sonda el amplificado de la región.
 Carriles: C, cepa parental (1021); M, Marcador de peso molecular marcado con digoxigenina; 1-6, mutantes TreS⁻ de *S. meliloti* 1021.

Anexo 3.1.4. Construcción de los mutantes dobles y el mutante triple en rutas de síntesis de trehalosa de *S. meliloti* 1021

Los mutantes dobles 10trOt (TreS⁻, OtsA⁻) y 10treSY (TreS⁻, TreY⁻) se obtuvieron mediante transducción. Se utilizó el mutante 10treS (TreS⁻) como receptor y, según el caso, se empleó como donador el mutante 10OtSS (OtsA⁻) o el 10MOTK (TreY⁻). Los nuevos mutantes se seleccionaron por la adquisición de la resistencia a Sm/Spc y Km, respectivamente, y se comprobaron seis colonias mediante hibridación, tal y como se describe en la construcción de los mutantes simples 10OtSS y 10MOTK.

El doble mutante 10OtM (OtsA⁻, TreY⁻) se obtuvo también mediante transducción, utilizando el mutante 10OtSS (OtsA⁻) como receptor y el 10MOTK (TreY⁻) como donador. Como en el caso anterior, los nuevos mutantes se seleccionaron por la adquisición de la resistencia a Km y se comprobaron cuatro colonias mediante hibridación, tal y como se describe en la construcción del mutante 10MOTK.

El mutante triple 10SYOt (TreS⁻, TreY⁻, OtsA⁻) se construyó utilizando el doble mutante 10treSY (TreS⁻, TreY⁻) como receptor y el mutante simple 10OtSS (OtsA⁻) como donador en la transducción. Los nuevos mutantes se seleccionaron por la adquisición de la resistencia a Sm/Spc y seis colonias se comprobaron mediante hibridación, tal y como se describe en la construcción del mutante 10OtSS.

Anexo 3.2. Construcción de mutantes en sistemas de síntesis de trehalosa de *M. loti* MAFF303099

Anexo 3.2.1. Construcción de un mutante en el gen *otsA1* de *M. loti* MAFF303099

Para la construcción de este mutante se amplificó, a partir del ADN genómico de la cepa parental *M. loti* MAFF303099, un fragmento de 2.435 pb (Fig. A3.7) que contenía el gen *mlr9595*, anotado como *otsA*, que nosotros hemos denominado *otsA1*. Se trata de un ORF muy pequeño precedido por el gen *msr9761* que tiene homología con la región 5' de genes *otsA* por lo que se cree que ambos genes constituyen una copia truncada de *otsA* presente en el genoma de *M. loti* MAFF303099. Para la amplificación del fragmento indicado se utilizaron los siguientes cebadores:

ots-loti-1	5'-GCTTGAGAAGGCTGGAAATG-3'
ots-loti-2	5'-TTGCTTCAACCTAATCGGAG-3'

El producto de PCR generado se clonó en el vector de clonación pGEM[®]-T Easy dando lugar al plásmido pGI_Ot_A. Posteriormente, se digirió con *Cla*I y se insertó un cassette de resistencia a Sm/Spc que se obtuvo a partir del vector pHP45Ω, digiriendo *Sma*I y purificando la banda correspondiente al cassette. De este modo se obtuvo la construcción pGI_Ot_{SS} de la que se aisló el inserto mediante una digestión *Eco*RI. El fragmento de ADN aislado se clonó en el vector pSUP202Pol4 y la nueva construcción se denominó pSI_Ot_{SS}. Dicha construcción se movilizó hasta la cepa MAFF303099 de *M. loti* para obtener el mutante llamado MO_tSS. Al tratarse de un vector suicida, este plásmido no puede replicarse en el fondo genético de *Rhizobium*, propiedad que permite seleccionar transconjugantes resistentes a Sm y Spc y sensibles a Tc, en los que se habrá producido el correspondiente intercambio alélico. En la figura A3.7 se muestra un esquema del fragmento amplificado y de la mutación resultante. La mutación se verificó en siete transconjugantes, mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *Sma*I y utilizando como sonda un fragmento *Sma*I aislado del amplificado y marcado con digoxigenina (Fig. A3.8). Esta sonda hibrida con el mismo fragmento *Sma*I de

1.268 pb presente en la cepa parental *M. loti* MAFF303099. La inserción del cassette en el mutante provoca que la banda correspondiente sea sustituida por otra de unas 3,3 Kb.

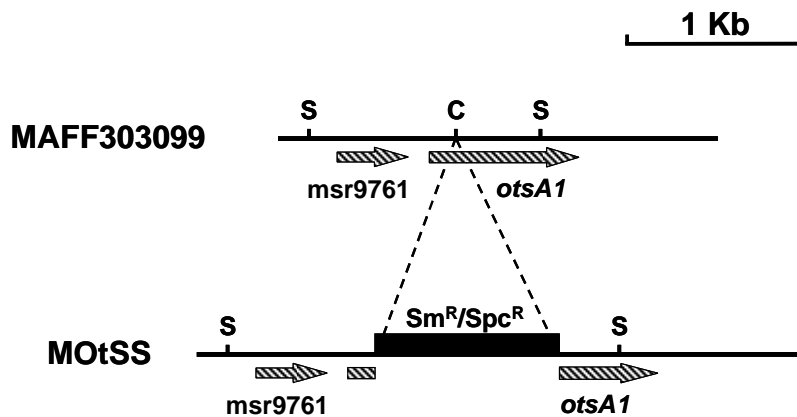


Figura A3.7.- Representación esquemática de la construcción del mutante MOtSS mediante inserción de un cassette de resistencia a Sm/Spc.
S: *SmaI*; C: *ClaI*

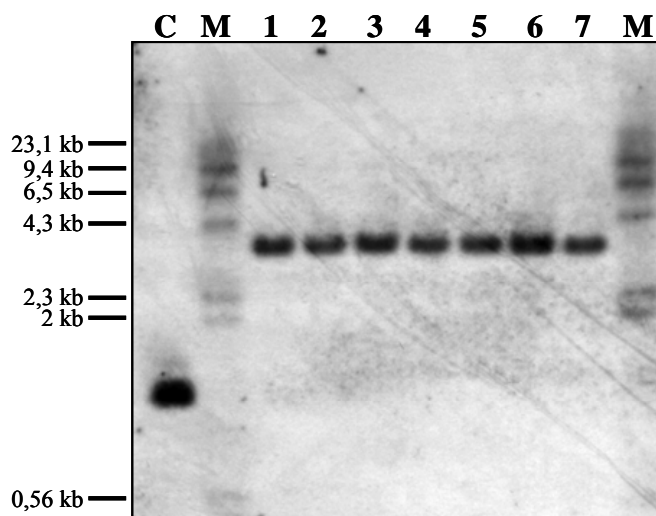


Figura A3.8.- Comprobación de mutantes MOtSS de *M. loti* mediante hibridación del ADN genómico digerido con *SmaI* y utilizando como sonda un fragmento *SmaI* de 1.268 pb procedente del amplificado de la región correspondiente.
Carriles: C, cepa parental (MAFF303099); M, Marcador de peso molecular marcado con digoxigenina; 1-7, mutantes OtsA⁻ de *M. loti* MAFF303099.

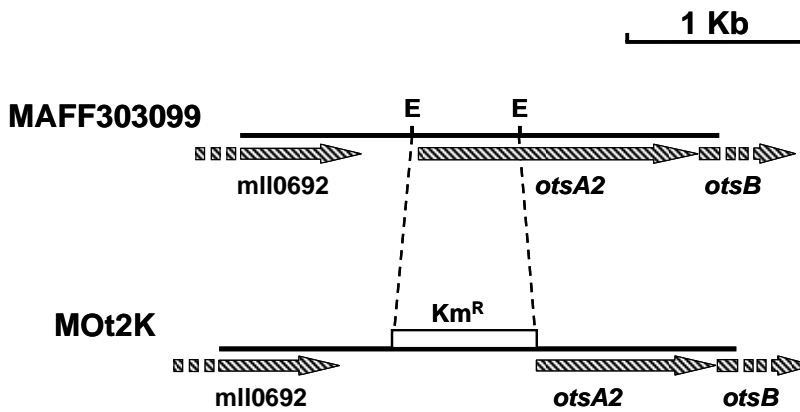


Figura A3.9.- Representación esquemática de la construcción del mutante MOt2K mediante delección e inserción de un cassette de resistencia a Km.
E: *EcoRI*

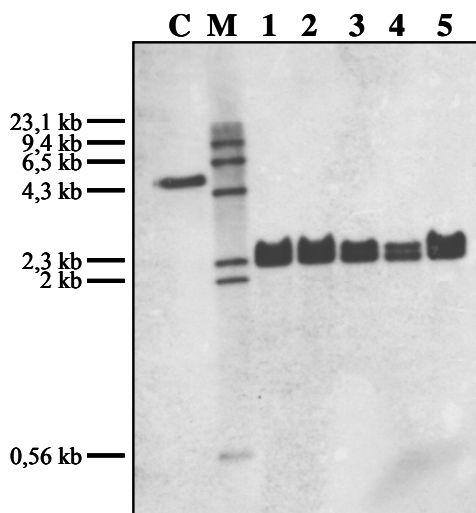


Figura A3.10.- Comprobación de mutantes MOt2K de *M. loti* mediante hibridación del ADN genómico digerido con *HindIII* y *BamHI* y utilizando como sonda el amplificado de la región correspondiente.
Carriles: C, cepa parental (MAFF303099); M, Marcador de peso molecular marcado con digoxigenina; 1-5, mutantes OtsA2⁻ de *M. loti* MAFF303099.

Anexo 3.3. Construcción de fusiones transcripcionales de los genes de sistemas de síntesis de trehalosa de *S. meliloti* 1021

Anexo 3.3.1. Construcción de una fusión transcripcional al gen *otsA* de *S. meliloti* 1021

Para la construcción de esta fusión se partió del plásmido pBSOt-10 y se clonó el fragmento *XbaI-EcoRI* que contenía el promotor del gen *otsA* en el vector p53gus dando lugar al plásmido p53otsA (Fig. A3.11). Este plásmido se transfirió mediante conjugación a *S. meliloti* 1021, donde su presencia se seleccionó por conferir resistencia a gentamicina y se comprobó mediante extracción de ADN plasmídico y determinación del perfil de restricción.

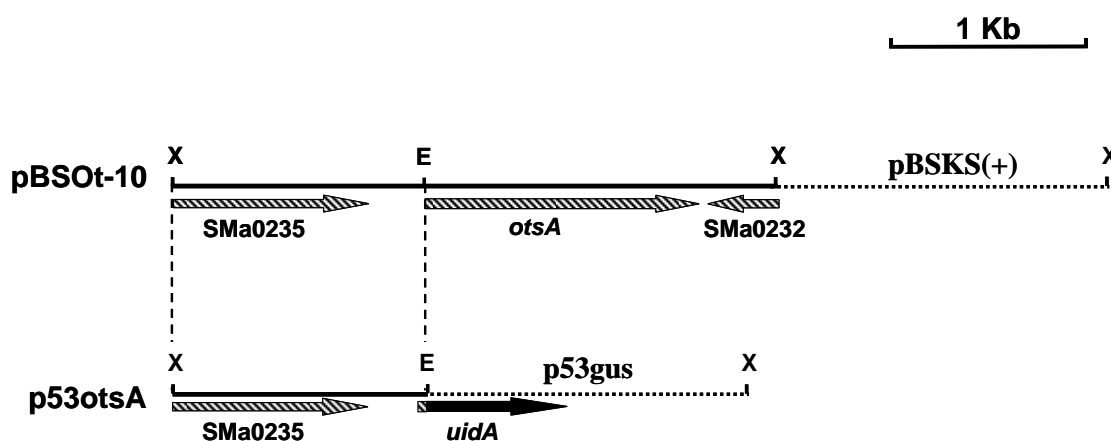


Figura A3.11.- Representación esquemática de la construcción del plásmido p53otsA que contiene la fusión transcripcional *otsA::uidA*.
X: *XbaI*; E: *EcoRI*.

Anexo 3.3.2. Construcción de una fusión transcripcional al gen *treY* de *S. meliloti* 1021

Para la construcción de esta fusión se partió del plásmido pGEMOT y se clonó el fragmento *EcoRI-XhoI* que contenía el promotor del gen *treY* en el vector p53gus dando lugar al plásmido p53MOTS (Fig. A3.12). Este plásmido se transfirió mediante conjugación a *S. meliloti* 1021, donde su presencia se seleccionó por la adquisición de la

resistencia a Gm y se comprobó mediante extracción de ADN plasmídico y determinación del perfil de restricción.

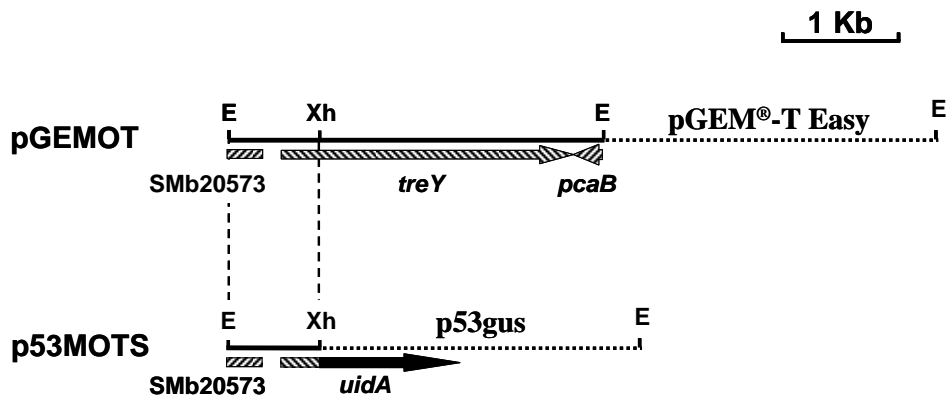


Figura A3.12.- Representación esquemática de la construcción del plásmido p53MOTS que contiene la fusión transcripcional *treY::uidA*.
E: *EcoRI*; Xh: *XhoI*.

Conclusiones

- 1.-El estrés hiperosmótico causado por la adición de NaCl o de sacarosa al medio de cultivo tiene efectos similares sobre el transcriptoma de *Sinorhizobium meliloti* 1021, provocando la inducción de un gran número de genes cuya función se desconoce y la represión de muchos genes que codifican proteínas de función conocida.
- 2.-La mayoría de los genes de *S. meliloti* 1021 que se sobreexpresan en respuesta a un choque osmótico se encuentran localizados en los plásmidos simbióticos, especialmente en el pSymB, mientras que los genes reprimidos son mayoritariamente cromosómicos.
- 3.-*S. meliloti* 1021 posee cuatro sistemas homólogos a transportadores de potasio conocidos: Kup1, Kup2, Trk y Kdp. La presencia de Trk o Kup1 es necesaria para el normal crecimiento en vida libre de la bacteria. Además, Trk es el sistema principalmente implicado en la adaptación a estrés osmótico, especialmente a bajo pH. Kdp está implicado en la adaptación a estrés osmótico en vida libre, y su importancia relativa aumenta en medios con bajo contenido de potasio. Por último, Kup2 no se encuentra específicamente relacionado con ninguno de los procesos estudiados.
- 4.-*M. loti* MAFF303099 presenta genes con elevada homología a tres sistemas de captación de potasio: Kup1, Kup2 y Kdp. El sistema Kup2 es importante para el crecimiento en vida libre y durante la adaptación a estrés osmótico. El sistema Kdp está implicado en la adaptación a estrés osmótico en medios con bajo contenido de potasio.
- 5.-Los mutantes obtenidos en sistemas de transporte de potasio de *M. loti* MAFF303099 presentan un comportamiento semejante al de la cepa parental durante el establecimiento de simbiosis con *Lotus tenuis*. Sin embargo, en *S. meliloti* 1021, la integridad de Trk o Kup1 es necesaria para el desarrollo de simbiosis eficientes con alfalfa y la carencia simultánea de ambos transportadores conduce a un retraso de la nodulación.

- 6.-** Existen genes homólogos a tres sistemas de síntesis de trehalosa en el genoma de *S. meliloti* 1021: OtsA, TreY y TreS. La acumulación de trehalosa necesaria para una correcta osmoadaptación a elevadas concentraciones de solutos depende principalmente de OtsA, aunque los otros dos sistemas, especialmente TreS, también se encuentran implicados en el proceso de osmoadaptación. Además, la expresión de los genes que codifican los tres sistemas aumenta en respuesta a un choque osmótico.
- 7.-** En *M. loti* MAFF303099 la acumulación de trehalosa en respuesta a un choque osmótico se produce a través de un único sistema: OtsA/OtsB, que es necesario para la correcta adaptación de la bacteria a medios hiperosmóticos.
- 8.-** La presencia de al menos un sistema implicado en la síntesis de trehalosa es importante en *S. meliloti* 1021 y *M. loti* MAFF303099 para el establecimiento de simbiosis con leguminosas. Así, la ausencia del sistema OtsA/OtsB provoca una disminución de la infectividad de *M. loti* MAFF303099 mientras que en *S. meliloti* 1021, la carencia de los tres sistemas descritos es causa de una menor competitividad durante la nodulación y conduce a una disminución de la eficiencia simbiótica.

Bibliografía

- Ahnert, F., Schmid, R., Altendorf, K. y Greie, J. C., 2006. "ATP binding properties of the soluble part of the KdpC subunit from the *Escherichia coli* K⁺-transporting KdpFABC P-type ATPase". *Biochemistry* **45**:11038-11046.
- Alloing, G., Travers, I., Sagot, B., LeRudulier, D. y Dupont, L., 2006. "Proline betaine uptake in *Sinorhizobium meliloti*: characterization of Prb, an Opp-like ABC transporter regulated by both proline betaine and salinity stress". *J. Bacteriol.* **188**: 6308-6317.
- Altendorf, K., Gassel, M., Puppe, W., Mollenkamp, T., Zeeck, A., Boddien, C., Fendler, K., Bamberg, E. y Bröse, S., 1998. "Structure and function of the Kdp-ATPase of *Escherichia coli*". *Acta Physiol. Scand.* **163**: 137-146.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J., 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
- Anjum, F., Rishi, W. y Ahmad, F., 2000. "Compatibility of osmolytes with Gibbs energy of stabilization of proteins". *Biochim. Biophys. Acta* **1476**: 75-84.
- Aparicio-Tejo, P. M., Arrese, I. y Becana, M., 2000. "Fijación Biológica de nitrógeno". En: Azcón-Bieto, J. y Talón, M., (eds.), "Fundamentos de Fisiología Vegetal". McGraw-Hill Interamericana. Madrid.
- Arakawa, T. y Timasheff, S. N., 1985. "The stabilization of proteins by osmolytes". *Biophys. J.* **47**: 411-414.
- Argüelles, J. C., 2000. "Physiological roles of trehalose in bacteria and yeast: a comparative analysis". *Arch. Microbiol.* **174**: 217-224.
- Auton, M., Baskakov, I., Bolen, C. L. y Bolen, D. W., 2001. "On identifying the fundamental forces of osmolyte-induced protein stability". *Biophys. J.* **80**: 558a-558a.
- Avonce, N., Leyman, B., Mascorro-Gallardo, O., Van Dijck, P., Thevelein, J. M. e Iturriaga, G., 2004. "The *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase AtTPSI gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signalling". *Plant Physiol.* **136**: 3649-3659.
- Avonce, N., Mendoza-Vargas, A., Morett, E. e Iturriaga, G., 2006. "Insights on the evolution of trehalose biosynthesis". *BMC Evolutionary Biol.* **6**: 106
- Baker, A., Sprent, J. I. y Wilson, J., 1995. "Effects of sodium chloride and mycorrhizal infection on the growth and nitrogen fixation of *Prosopis juliflora*". *Symbiosis* **19**: 39-51.
- Bakker, E. P., Booth, I. R., Dinnbier, U., Epstein, W. y Gajewska, A., 1987. "Evidence for multiple K⁺ export systems in *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* **169**: 3743-3749.

- Barra, L., Pica, N., Gouffi, K., Walker, G. C., Blanco, C. y Trautwetter, A.,** 2003. "Glucose 6-phosphate dehydrogenase is required for sucrose and trehalose to be efficient osmoprotectants in *Sinorhizobium meliloti*". *FEMS Microbiol. Lett.* **229**: 183-188.
- Barnett, M. J., Toman, C. J., Fisher, R. F. y Long., S. R.,** 2004. "A dual-genome symbiosis chip for coordinate study of signal exchange and development in a prokaryote-host interaction". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 16636-16641.
- Baskakov, I. y Bolen, D. W.,** 1998. "Forcing thermodynamically unfolded proteins to fold". *J. Biol. Chem.* **273**: 4831-4834.
- Becker, A., Schmidt, M., Jäger, W. y Pühler, A.,** 1995. "New gentamicin-resistance and promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions". *Gene* **162**: 37-39.
- Beijerinck, M. W.,** 1888. "Cultur des *Bacillus radicolica* aus den Knöllchen". *Bot. Ztg.* **46**: 740-750.
- Benaroudj, N., Lee, D. H. y Goldberg, A. L.,** 2001. "Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals". *J. Biol. Chem.* **276**: 24261-24267.
- Beringer, J. E.,** 1974. "R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*". *J. Gen. Microbiol.* **84**: 188-198.
- Bernard, T., Pocard, J.-A., Perroud, B. y LeRudulier, D.,** 1986. "Variations in the response of salt-stressed *Rhizobium* strains to betaines". *Arch. Microbiol.* **143**: 359-364.
- Bernard, T., Jebbar, M., Rassouli, Y., Himdikabbab, S., Hamelin, J. y Blanco, C.,** 1993. "Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens*". *J. Gen. Microbiol.* **139**: 129-136.
- Bertrand, J., Altendorf, K. y Bramkamp, M.,** 2004. "Amino acid substitutions in putative selectivity filter regions III and IV in KdpA alter ion selectivity of the KdpFABC complex from *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* **186**: 5519-5522.
- Bhagwat, A. A., Gross, K. C., Tully, R. E. y Keister, D. L.,** 1996. "β-glucan synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: Characterization of a new locus (*ndvC*) influencing β-(1-6) linkages". *J. Bacteriol.* **178**: 4635-4642.
- Blatny, J. M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H. C., Haugan, K. y Valla, S.,** 1997. "Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon". *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 370-379.

- Bohin, J-P.**, 2000. "Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria". *FEMS Microbiol. Lett.* **186**: 11-19.
- Bolaños, L., El-Hamdaoui, A. y Bonilla, I.**, 2003. "Recovery of development and functionality of nodules and plant growth in salt-stressed *Pisum sativum*-*Rhizobium leguminosarum* symbiosis by boron and calcium". *J. Plant Physiol.* **160**: 1493-1497.
- Bolen, D. W. y Baskakov, I. V.**, 2001. "The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding". *J. Mol. Biol.* **310**: 955-963.
- Boncompagni, E., Østerås, M., Poggi, M.-C. y LeRudulier, D.**, 1999. "Occurrence of choline and glycine betaine uptake and metabolism in the family *Rhizobiaceae* and their roles in osmoprotection". *Appl. Env. Microbiol.* **65**: 2072-2077.
- Boncompagni, E., Dupont, L., Mignot, T., Østerås, M., Lambert, A., Poggi, M.-C. y LeRudulier, D.**, 2000. "Characterization of a *Sinorhizobium meliloti* ATP-binding cassette histidine transporter also involved in betaine and proline uptake". *J. Bacteriol.* **182**: 3717-3725.
- Boos, W. Ehmann, U., Forki, W., Klein, M., Rimmel, M. y Postma, P.**, 1990. "Trehalose transport and metabolism in *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* **172**: 3450-3461.
- Bordeleau, L. M. y Prévost, D.**, 1994. "Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments". *Plant Soil* **161**: 115-125.
- Boscari, A., Mandon, K., Dupont, L., Poggi, M.-C. y LeRudulier, D.**, 2002. "BetS is a major glycine betaine/proline betaine transporter required for early osmotic adjustment in *Sinorhizobium meliloti*". *J. Bacteriol.* **184**: 2654-2663.
- Boscari, A., Van de Sype, G., LeRudulier, D. y Mandon, K.**, 2006. "Overexpression of BetS, a *Sinorhizobium meliloti* high-affinity betaine transporter, in bacteroids from *Medicago sativa* nodules sustains nitrogen fixation during early salt stress adaptation". *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**: 896-903.
- Botsford, J. L.**, 1984. "Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: inhibition of growth by salts". *Arch. Microbiol.* **137**: 124-127.
- Botsford, J. y Lewis, T.**, 1990. "Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: production of glutamic acid in response to osmotic stress". *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 488-494.
- Bouhmouch, I., Souad-Mouhsine, B., Brhada, F. y Aurag, J.**, 2005. "Influence of host cultivars and *Rhizobium* species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress". *J. Plant Physiol.* **162**: 1103-1113.

- Bowen, G. D. y Rovira, A. D.**, 1976. "Microbial colonization of plant roots". *Annu. Rev. Phytopathol.* **14**: 121-144.
- Bramkamp, M. y Altendorf, K.**, 2005. "Single amino acid substitution in the putative transmembrane helix V in KdpB of the KdpFABC complex of *Escherichia coli* uncouples ATPase activity and ion transport". *Biochemistry* **44**: 8260-8266.
- Breedveld, M. W., Zevenhuizen, L. P. y Zehnder, A. J.**, 1990. "Excessive excretion of cyclic β -(1,2)-glucan by *Rhizobium trifolii* TA-1". *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2080-2086.
- Bremer, R. y Krämer, R.**, 2000. "Coping with osmotic challenges: Osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria". En: Storz, G. y Hengge-Aronis, R., (eds.), "Bacterial stress responses". pp. 79-97, ASM Press, Washington, D.C.
- Brewin, N. J.**, 1998. "Tissue and cell invasion by *Rhizobium*: the structure and development of infection threads and symbiosomes". En: Spaink, H., Kondorosi, A. y Hooykaas, P. (eds.), "The *Rhizobiaceae*: Molecular biology of model plant-associated bacteria". pp. 417-429, Kluwer Academic Publishers.
- Brown, A. D.**, 1976. "Microbial water stress". *Bacteriol. Rev.* **40**: 803-846.
- Butler, Y. X., Abhayawardhane, Y. y Stewart, G. C.**, 1993. "Amplification of the *Bacillus subtilis maf* gene results in arrested septum formation". *J. Bacteriol.* **175**: 3139-3145.
- Buurman, E. T., McLaggan, D., Naprstek, J. y Epstein, W.**, 2004. "Multiple paths for nonphysiological transport of K^+ in *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* **186**: 4238-4245.
- Cabib, E. y Lenoir, L. F.**, 1958. "The biosynthesis of trehalose phosphate". *J. Biol. Chem.* **231**: 259-275.
- Caldas, T., Binet, E., Bouloc, T. y Richarme, G.**, 2000. "Translational defects of *Escherichia coli* mutants deficient in the Um₂₅₅₂ 23S ribosomal RNA methyltransferase RrmJ/FTSJ". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**: 714-718.
- Cánovas, D., Fletcher, S., Hayashi, M. y Csonka, L. N.**, 2001. "Role of trehalose in growth at high temperature of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium". *J. Bacteriol.* **183**: 3365-3371.
- Capp, M. W., Cayley, D. S., Zhang, W., Guttman, H. J., Melcher, S. E., Saecker, R. M., Anderson, C. F. y Record, M. T. Jr.**, 1996. "Compensating effects of opposing changes in putrescine (2+) and K^+ concentrations on *lac* repressor-*lac* operator binding: *in vitro* thermodynamic analysis and *in vivo* relevance". *J. Mol. Biol.* **258**: 25-36.
- Cassab, G. I.**, 1998. "Plant cell wall proteins". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 281-309.

- Cayley, S., Lewis, B. A. y Record, M. T. Jr.**, 1992. "Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12". *J. Bacteriol.* **174**: 1586-1595.
- Chen, R., Bhagwat, A. A., Yaklich, R. y Keister, D. L.**, 2002. "Characterization of *ndvD*, the third gene involved in the synthesis of cyclic β -(1-3),(1-6)-D-glucans in *Bradyrhizobium japonicum*". *Can. J. Microbiol.* **48**: 1008-1016.
- Christian, J. H. B.**, 1955. "The influence of nutrition on the water relations of *Salmonella oranienburg*". *Aust. J. Biol. Sci.* **8**: 75-83.
- Christian, J. H. B. y Waltho, J.**, 1961. "The sodium and potassium content of non-halophilic bacteria in relation to salt tolerance". *J. Gen. Microbiol.* **25**: 97-102.
- Copeland, A., Lucas, S., Lapidus, A., Barry, K., Glavina del Río, T., Dalin, E., Tice, H., Bruce, D., Pitluck, S. y Richardson, P.**, 2006. "Sequencing of the draft genome and assembly of *Sinorhizobium medicae* WSM419". Enviado en agosto de 2006 a las bases de datos EMBL, GenBank y DDBJ.
- Cordovilla, M. P., Ligeró, F. y Lluch, C.**, 1994. "The effect of salinity on N₂ fixation and assimilation in *Vicia faba*". *J. Exp. Bot.* **45**: 1483-1488.
- Cordovilla, M. P., Ligeró, F. y Lluch, C.**, 1996. "Growth and nitrogen assimilation in nodules in response to nitrate levels in *Vicia faba* under salt stress". *J. Exp. Bot.* **47**: 203-210.
- Cosgrove, D. J., Bedinger, P. y Durachko, D. M.**, 1997. "Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 6559-6564.
- Cosgrove, D. J., Li, L. C., Cho, H. T., Hoffmann-Benning, S., Moore, R. C. y Blecker, D.**, 2002. "The growing world of expansins". *Plant Cell Physiol.* **43**: 1436-1444.
- Crowe, J. H., Carpenter, J. F. y Crowe, L. M.**, 1998. "The role of vitrification in anhydrobiosis". *Annu. Rev. Physiol.* **60**: 73-103.
- Csonka, L. N.**, 1982. "A third L-proline permease in *Salmonella typhimurium* which functions in media of elevated osmotic strength". *J. Bacteriol.* **151**: 1433-1443.
- Csonka, L. N.**, 1988. "Regulation of cytoplasmic proline levels in *Salmonella typhimurium*: effect of osmotic stress on synthesis, degradation, and cellular retention of proline". *J. Bacteriol.* **170**: 2374-2378.
- Csonka, L. N.**, 1989. "Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress". *Microbiol. Rev.* **53**: 121-147.
- Csonka, L. H. y Hanson, A. D.**, 1991. "Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology". *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 569-606.

- Csonka, L. N. y Epstein, W.**, 1996. "Osmoregulation". En: Neidhardt, F. C., Curtiss, R. III, Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B. B., Magasanik, Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. y Umberger, H. E., (eds.), "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, cellular and molecular biology". Vol. I, pp. 1210-1223, Washington, D.C., ASM Press.
- Culham, D. E., Tripet, B., Racher, K. I., Voegelé, R. T., Hodges, R. S. y Wood, J. M.**, 2000. "The role of the carboxyl terminal alpha-helical coiled-coil domain in osmosensing by transport ProP of *Escherichia coli*". *J. Mol. Recognit.* **13**: 309-322.
- Davey, M. E., y de Bruijn, F. J.**, 2000. "A homologue of the tryptophan-rich sensory protein TspO and FixL regulate a novel nutrient deprivation-induced *Sinorhizobium meliloti* locus". *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5353-5359.
- Davies, B. W. y Walker, G. C.**, 2007. "Disruption of *sitA* compromises *Sinorhizobium meliloti* for manganese uptake required for protection against oxidative stress". *J. Bacteriol.* **189**: 2101-2109.
- Delgado, M. J., Garrido, J. M., Ligeró, F. y Lluch, C.**, 1993. "Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under sodium chloride stress". *Physiol. Plant.* **89**: 824-829.
- De Rudder, K. E. E., López-Lara, I. M. y Geiger, O.**, 2000. "Inactivation of the gene for phospholipid N-methyltransferase in *Sinorhizobium meliloti*: Phosphatidylcholine is required for normal growth". *Mol. Microbiol.* **37**: 763-772.
- De Smet, K. A., Weston, A., Brown, I. N. Young, D. B., Robertson, B. D.**, 2000. "Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria". *Microbiol.* **146**: 199-208.
- Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R. y Bakker, E. P.**, 1988. "Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells in *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations". *Arch. Microbiol.* **150**: 348-357.
- Djordjevic, M. A., Chen, H. C., Natera, S., Van Noorden, G., Menzel, C., Taylor, S., Renard, C., Geiger, O., el consorcio de secuenciación del ADN de *Sinorhizobium*, y Weiller, G. F.**, 2003. "A global analysis of protein expression profiles in *Sinorhizobium meliloti*: discovery of new genes for nodule occupancy and stress adaptation". *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**: 508-524.
- Djordjevic, M. A.**, 2004. "*Sinorhizobium meliloti* metabolism in the nodule: A proteomic perspective". *Proteomics* **4**: 1859-1872.

- Domínguez-Ferreras, A., Pérez-Arnedo, R., Becker, A., Olivares, J., Soto, M. J. y Sanjuán, J.,** 2006. “Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid pSymb for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*”. *J. Bacteriol.* **188**: 7617-7625.
- Dondrup, M., Goesmann, A., Bartels, D., Kalinowski, J., Krause, L., Linke, B., Rupp, O., Sczyrba, A., Pühler, A. y Meyer, F.,** 2003. “EMMA: A platform for consistent storage and efficient analysis of microarray data”. *J. Biotechnol.* **106**: 135-146.
- Dupont, L., Garcia, I., Poggi, M.-C., Alloing, G., Mandon, K. y LeRudulier, D.,** 2004. “The *Sinorhizobium meliloti* ABC transporter Cho is highly specific for choline and expressed in bacteroids from *Medicago sativa* nodules”. *J. Bacteriol.* **186**: 5988-5996.
- Durell, S. R., Hao, Y., Nakamura, T., Bakker, E. P. y Guy, H. R.,** 1999. “Evolutionary relationship between K⁺ channels and symporters”. *Biophys. J.* **77**: 775-788.
- Durell, S. R., Bakker, E. P. y Guy, H. R.,** 2000. “Does the KdpA subunit from the high affinity K⁺-translocating P-type KDP-ATPase have a structure similar to that of K⁺ channels?” *Biophys. J.* **78**: 188-199.
- Dylan, T., Helinski, D. R. y Ditta, G. S.,** 1990. Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires β -(1, 2)-glucan. *J. Bacteriol.* **172**: 1400-1408.
- Eastmond, P. J., van Dijken, A. J. H., Spielman, M., Kerr, A., Tissier, A. F., Dickinson, H. G., Jones, J. D. G., Smeekens, S. C. y Graham, I. A.,** 2002. “Trehalose-6-phosphate synthase I, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation”. *Plant J.* **29**: 225-235.
- Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I. y Carroll, D.,** 2003. “New insights on trehalose: A multifunctional molecule”. *Glycobiology* **13**: 17R-27R.
- Elsheikh, E. A. E. y Wood, M.,** 1990. “Salt effects on survival and multiplication of chickpea and soybean rhizobia”. *Soil Biol. Biochem.* **22**: 343-347.
- Epstein, W. y Schultz, S. G.,** 1965. “Cation transport in *Escherichia coli*. V. Regulation of cation content”. *J. Gen. Physiol.* **49**: 221-234.
- Epstein, W. y Laimins, L.,** 1980. “Potassium transport in *Escherichia coli*: diverse systems with common controlling forces”. *Trends Biochem. Sci.* **5**: 21-23.
- Epstein, W.,** 1992. “Kdp, a bacterial P-type ATPase whose expression and activity are regulated by turgor pressure”. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **607**: 193-199.
- Epstein, W.,** 2003. “The roles and regulation of potassium in bacteria”. *Proq. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **75**: 293-320.

- Eshoo, M. W.**, 1988. “*lac* fusion analysis of the *bet* genes of *Escherichia coli*: regulation by osmolarity, temperature, oxygen, choline, and glycine betaine”. *J. Bacteriol.* **170**: 5208-5215.
- Faatz, E., Middendorf, A. y Bremer, E.**, 1988. “Cloned structural genes for the osmotically regulated binding-protein-dependent glycine betaine transport system (ProU) of *Escherichia coli* K-12”. *Mol. Microbiol.* **2**: 265-279.
- FAO**, 2005. Global Network on Integrated Soil Management for Sustainable Use of Salt-Affected Soils. FAO Land and Plant Nutrition Management Services, Rome, Italy. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>.
- Fariás-Rodríguez, R., Mellor, R. B., Arias, C. y Peña-Cabriales, J. J.**, 1998. “The accumulation of trehalose in nodules of several cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its correlation with resistance to drought stress”. *Physiol. Plant.* **102**: 353-359.
- Felitsky, D. J., Cannon, J. G., Capp, M. W., Hong, J., Van Wynsberghe, A. W., Anderson, C. J. y Record, M. T. Jr.**, 2004. “The exclusion of glycine betaine from anionic biopolymer surface: why glycine betaine is an effective osmoprotectant but also a compatible solute”. *Biochemistry* **43**: 13732-14743.
- Fellay, R., Frey, J. y Krisch, H.**, 1987. “Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis of gram-negative bacteria”. *Gene* **52**: 147-154.
- Fernández-Pascual, M., De Lorenzo, C., De Felipe, M. R., Rajalakshmi, S., Gordon, A. J., Thomas, B. J. y Minchin, F. R.**, 1996. “Possible reasons for relative salt stress tolerance in nodules of white lupin cv. Multolupa”. *J. Exp. Bot.* **47**: 1709-1716.
- Fiedler, W. y Rotering, H.**, 1988. “Properties of *Escherichia coli* mutants lacking membrane-derived oligosaccharides”. *J. Biol. Chem.* **263**: 14684-14689.
- Figurski, D. H. y Helinski, D. R.**, 1979. “Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 1648-1652.
- Finan, T. M., Hartweig, E., LeMieux, K., Bergman, K., Walker, G. C. y Signer, E. R.**, 1984. “General transduction in *Rhizobium meliloti*”. *J. Bacteriol.* **159**: 120-124.
- Finan, T. M., Weidner, S., Wong, K., Buhrmester, J., Chain, P., Vorhölter, F. J., Hernandez-Lucas, I., Becker, A., Cowie, A., Gouzy, J., Golding, B. y Pühler, A.**, 2001.

- “The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from de N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 9889-9894.
- Fischer, H. M., Babst, M., Kaspar, T., Acuña, G., Arigoni, F. y Hennecke, H.**, 1993. “One member of a *groESL*-like chaperonin multigene family of *Bradyrhizobium japonicum* is co-regulated with symbiotic nitrogen fixation genes”. *EMBO J.* **12**: 2901-2912.
- Fougère, R., LeRudulier, D. y Streeter, J. G.**, 1991. “Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.)”. *Plant Physiol.* **96**: 1228-1236.
- Frank, B.**, 1989. “Ueber die Pilzymbiose der Leguminosen”. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **7**: 332-346.
- Franssen, H. J., Vijn, I., Yang, W. C. y Bisseling, T.**, 1992. “Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis”. *Plant Mol. Biol.* **19**: 89-107.
- 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.
- Fried, M. G., Stickle, D. F., Smirnakis, K. V., Adams, C., MacDonald, D. y Lu, P.**, 2002. “Role of hydration in the binding of *lac* repressor to DNA”. *J. Biol. Chem.* **277**: 50676-50682.
- Fujihara, S. y Yoneyama, T.**, 1993. “Effects of pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean rhizobia *Rhizobium fredii* P220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017”. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1104-1109.
- 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.
- Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Pühler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R. W., Dréano, S., Federspiel, N. A., Fisher, R. F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R. W., Jones, T., Khan, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M. C., Pohl, T. M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thébault, P., Vandenbol, M., Vorhölter, F.-J., Weidner, S., Wells, D. H., Wong, K., Yeh, K-C. y Batut, J.**, 2001. “The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*”. *Science* **293**: 668-672.
- Galinski, E. A. y Trüper, H. G.**, 1982. “Betaine, a compatible solute in the extremely halophilic phototrophic bacterium *Ectothiorhodospira*”. *Eur. J. Biochem.* **149**: 135-139.

- Galinski, E. A. y Trüper, H. G.**, 1994. "Microbial behaviour in salt stressed ecosystems". *FEMS Microbiol. Rev.* **15**: 95-108.
- Galinski, E. A.**, 1995. "Osmoadaptation in bacteria". *Adv. Microb. Physiol.* **37**: 273-328.
- Gancedo, C. y Flores, C. L.**, 2004. "The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the file of yeast and fungi". *FEMS Yeast Res.* **4**: 351-359.
- García-Estepa, R., Argandoña, M., Reina-Bueno, M., Capote, N., Iglesias-Guerra, F., Nieto, J.J. y Vargas, C.**, 2006. "The *ectD* gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*". *J. Bacteriol.* **188**: 3774-3784.
- García-Rodríguez, F. M. y Toro, N.**, 2000. "*Sinorhizobium meliloti nfe* (nodulation formation efficiency) genes exhibit temporal and spatial expression patterns similar to those of genes involved in symbiotic nitrogen fixation". *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 583-591.
- Gassel, M. y Altendorf, K.**, 2001. "Analysis of KdpC of the K⁺-transporting KdpFABC complex of *Escherichia coli*". *Eur. J. Biochem.* **268**: 1772-1781.
- Gjæver, H. M., Styrvold, O. B., Kaasen, E. y Strøm, A. R.**, 1988. "Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* **170**: 2841-4849.
- Giraud, E., Moulin, L., VAllenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J. C., Jaubert, M., Simon, D., Cartieaux, F., Prin, Y., Bena, G., Hannibal, L., Fardoux, J., Kojadinovic, M., Vuillet, L., Lajus, A., Cruveiller, S., Rouy, Z., Mangenot, S., Segurens, B., Dossat, C., Franck, W. L., Chang, W.-S., Saunders, E., Bruce, D., Richardson, P., Normand, P., Dreyfus, B., Pignol, D., Stacey, G., Emerich, D., Verméglio, A., Médigue, C. y Sadowsky, M.**, 2007. "Legumes symbioses: Absence of *nod* genes in photosynthetic Bradyrhizobia". *Science* **316**: 1307-1312.
- Glaasker, E., Konings, W. N. y Poolman, B.**, 1996. "Glycine betaine fluxes in *Lactobacillus plantarum* during osmostasis and hyper- and hypo-osmotic shock". *J. Biol. Chem.* **271**: 10060-10065.
- Goddijn, O. J. M. y van Dun, K.**, 1999. "Trehalose metabolism in plants". *Trends Plant Sci.* **4**: 315-318.
- Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A. P., Tomoyasu, T. y Bukau, B.**, 1999. "Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 13732-13737.

- González, V., Santamaría, R. I., Bustos, P., Hernández-González, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., Janga, S. C. Ramírez, M. A., Jiménez-Jacinto, V., Collado-Vides, J. y Davila, G., 2006.** “The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 3834-3839.
- Gouffi, K., Pichereau, V., Rolland, J.-P., Thomas, D., Bernard, T. y Blanco, C., 1998.** “Sucrose is a nonaccumulated osmoprotectant in *Sinorhizobium meliloti*”. *J. Bacteriol.* **180**: 5044-5051.
- Gouffi, K., Pica, N., Pichereau, V. y Blanco, C., 1999.** “Disaccharides as a new class of nonaccumulated osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*”. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1491-1500.
- Gouffi, K. y Blanco, C., 2000.** “Is the accumulation of osmoprotectant the unique mechanism involved in bacterial osmoprotection?” *Int. J. Food Microbiol.* **55**: 171-174.
- Greenway, H. y Munns, R., 1980.** “Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes”. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**: 149-190.
- Grogan, D. W. y Cronan, J. E. Jr., 1997.** “Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria”. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 429-441.
- Grothe, S., Krogsrud, R. L., McClellan, D. J., Milner, J. L. y Wood, J. M., 1986.** “Proline transport and osmotic stress response in *Escherichia coli* K-12”. *J. Bacteriol.* **166**: 253-259.
- Guillot, A., Obis, D. y Mistou, M.-Y., 2000.** “Fatty acid membrane composition and activation of glycine-betaine transport in *Lactococcus lactis* subjected to osmotic stress”. *Int. J. Food Microbiol.* **55**: 47-51.
- Han, Y., Zhou, D., Pang, X., Zhang, L., Song, Y., Tong, Z., Bao, J., Dai, E., Wang, J., Guo, Z., Zhai, J., Du, Z., Wang, X., Wang, J., Huang, P. y Yang, R., 2005.** “Comparative transcriptome analysis of *Yersinia pestis* in response to hyperosmotic and high-salinity stress”. *Res. Microbiol.* **156**: 403-415.
- Harms, C., Domoto, Y., Celik, C., Rahe, E., Stumpe, S., Schmid, R., Nakamura, T. y Bakker, E. P., 2001.** “Identification of the ABC protein SapD as the subunit that confers ATP dependence to the K⁺-uptake systems TrkH and TrkG from *Escherichia coli* K-12”. *Microbiology* **147**: 2991-3003.
- Hartl, F. U. y Hayer-Hartl, M., 2002.** “Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein”. *Science.* **295**: 1852-1858.

- Haupt, M., Bramkamp, M., Heller, M., Coles, M., Deckers-Hebestreit, G., Herkenhoff-Hesselmann, B., Altendorf, K. y Kessler, H.,** 2006. "The holo-form of the nucleotide binding domain of the KdpFABC complex from *Escherichia coli* reveals a new binding mode". *J. Biol. Chem.* **181**: 9641-9649.
- Hengge-Aronis, R., Klein, W., Lange, R., Rimmel, M. y Boss, W.,** 1991. "Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* **173**: 7918-7924.
- Hengge-Aronis, R.,** 1996. "Back to log-phase: σ^s as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*". *Mol. Microbiol.* **21**: 887-893.
- Higashiyama, T.,** 2002. "Novel functions and applications of trehalose". *Pure Appl. Chem.* **74**: 1263-1269.
- Higgins, C. F., Cairney, J., Stirling, D. A., Sutherland, L. y Booth, I. R.,** 1987. "Osmotic regulation of gene expression: Ionic strength as an intracellular signal?". *Trends Biochem. Sci.* **12**: 339-344.
- Higgins, C. F.,** 1992. "ABC transporters: from microorganisms to man". *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**: 67-113.
- Hoelzle, I. y Streeter, J. G.,** 1990. "Increased accumulation of trehalose in rhizobia cultured under 1% oxygen". *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3213-2315.
- Hohmann, S.,** 2002. "Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 300-372.
- Holtmann, G., Bakker, E.P., Uozumi, N. y Bremer, E.,** 2003. "KtrAB and KtrCD: two K^+ -uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity". *J. Bacteriol.* **185**: 1289-1298.
- Hong, J., Capp, M. W., Anderson, C. F., Soecker, R. M., Felitsky, D. J., Anderson, M. W. y Record, M. T. Jr.,** 2004. "Preferential interactions of glycine betaine and of urea with DNA: Implications for DNA hydration and for effects of these solutes on DNA stability". *Biochemistry* **43**: 14744-14758.
- Horlacher, R., Uhland, K., Klein, W., Ehrmann, M. y Boos, W.,** 1996. "Characterization of a cytoplasmic trehalase of *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* **178**: 625-627.
- Horlacher, R. y Boos, W.,** 1997. "Characterization of TreR, the major regulator of the *Escherichia coli* trehalose system". *J. Biol. Chem.* **272**: 13026-13032.

- Houssin, C., Eynard, N., Shechter, E. y Ghazi, A.,** 1991. "Effect of osmotic pressure on membrane energy-linked functions in *Escherichia coli*". *Biochim. Biophys. Acta* **1056**: 76-84.
- Howells, A. M., Bullifent, H. L., Dhaliwal, K., Griffin, K., García de Castro, A., Frith, G., Tunnacliffe, A. y Titball, R. W.,** 2002. "Role of trehalose biosynthesis in environmental survival and virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium". *Res. Microbiol.* **153**: 281-287.
- Ichige, A. y Walker, G. C.,** 1997. "Genetic analysis of the *Rhizobium meliloti* *bacA* gene: functional interchangeability with the *Escherichia coli* *sbmA* gene and phenotypes of mutants". *J. Bacteriol.* **179**: 209-216.
- Igarashi, K. y Kashiwagi, K.,** 1999. "Polyamine transport in bacteria and yeast". *Biochem. J.* **344**: 633-642.
- Jebbar, M., Talibart, R., Gloux, K., Bernard, T. y Blanco, C.,** 1992. "Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: Uptake and accumulation characteristics". *J. Bacteriol.* **174**: 5027-5035.
- Jebbar, M., Sohn-Bösser, L., Bremer, E., Bernard, T. y Blanco, C.,** 2005. "Ectoine-induced proteins in *Sinorhizobium meliloti* include an ectoine ABC-type transporter involved in osmoprotection and ectoine catabolism". *J. Bacteriol.* **187**: 1293-1304.
- Jensen, J. B., Peters, N. K. y Bhuvaneshwari, T. V.,** 2002. "Redundancy in periplasmic binding protein-dependent transport systems for trehalose, sucrose, and maltose in *Sinorhizobium meliloti*". *J. Bacteriol.* **184**: 2978-2986.
- Jensen, J. B., Ampomah, O. Y., Darrah, R., Peters, N. K. y Bhuvaneshwari, T. V.,** 2005. "Role of trehalose transport and utilization in *Sinorhizobium meliloti*-alfalfa interactions". *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**: 694-702.
- 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
- Jung, K. y Altendorf, K.,** 1998. "Individual substitutions of clustered arginine residues of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* modulate the ratio of kinase to phosphatase activity". *J. Biol. Chem.* **275**: 17080-17085.
- Kandror, O., DeLeon, A. y Goldberg, A. L.,** 2002. "Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 9727-9732.

- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. y Tabata, S., 2000.** “Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*”. *DNA Res.* **7**: 331-338.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M. y Tabata, S., 2002.** “Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110”. *DNA Res.* **9**:189-197.
- Kanesaki, Y., Suzuki, I., Allakhverdiev, S. I., Mikami, K. y Murata, N., 2002.** “Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**: 339-348.
- Kaplan, J. H., 2002.** “Biochemistry of Na, K-ATPase”. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 511-545.
- Kempf, G. y Bremer, D., 1998.** “Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments”. *Arch. Microbiol.* **170**: 319-330.
- Kennedy, E. P., 1982.** “Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 1092-1095.
- Kennedy, E. P., 1987.** “Membrane-derived oligosaccharides”. En: Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. y Umberger, H. E., (eds.), “*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology”. pp. 672-679, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Kereszt, A., Kiss, E., Reuhs, B. L., Carlson, R. W., Kondorosi, A. y Putnoky, P., 1998.** “Novel *rkp* gene clusters of *Sinorhizobium meliloti* involved in capsular polysaccharide production and invasion of the symbiotic nodule: the *rkpK* gene encodes a UDP-glucose dehydrogenase”. *J. Bacteriol.* **180**: 5426-5431.
- Keyser, H. H., van Berkum, P. y Weber, D. F., 1982.** “A comparative study of the physiology of symbioses formed by *Rhizobium japonicum* with *Glycine max*, *Vigna unguiculata*, and *Macroptilium atropurpureum*”. *Plant Physiol.* **70**: 1626-1630.
- Kiss, E., Huguet, T., Poinot, V. y Batut, J., 2004.** The *typA* gene is required for stress adaptation as well as for symbiosis of *Sinorhizobium meliloti* 1021 with certain *Medicago truncatula* lines”. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**: 235-244.

- Kobayashi, K., Kato, M., Miura, Y., Kettoku, M., Komeda, T. e Iwamatsu, A.,** 1996. "Gene cloning and expression of new trehalose-producing enzymes from the hyperthermophilic archaeum *Sulfolobus solfataricus* KM1". *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**: 1882-1885.
- Kraegeloh, A., Amendt, B. y Kunte, H. J.,** 2005. "Potassium transport in a halophilic member of the bacteria domain: Identification and characterization of the K⁺ uptake systems TrkH and TrkI from *Halomonas elongata* DSM 2581T". *J. Bacteriol.* **187**: 1036-1043.
- Krol, E. y Becker, A.,** 2004. "Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011". *Mol. Gen. Genomics.* **272**: 1-17.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F. y Danchin, A.,** 1997. "The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*". *Nature* **390**: 249-256.
- Lamark, T., Kaasen, I., Eshoo, M. W., Falkenberg, P., McDougall, J. y Strøm, A. R.,** 1991. "DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*". *Mol. Microbiol.* **5**: 1049-1064.
- Landfald, B. y Strøm, A. R.,** 1986. "Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* **165**: 849-855.
- Larsen, P. I., Sydnes, L. K., Landfald, B. y Strøm, A. R.,** 1987. "Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose". *Arch. Microbiol.* **147**: 1-7.
- Lederberg, E. M. y Cohen, S. N.,** 1974. "Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid". *J. Bacteriol.* **119**: 1072-1074.
- Lee, J. H., Park, N. Y., Lee, M. H. y Choi, S. H.,** 2003. "Characterization of the *Vibrio vulnificus* *putAP* operon, encoding proline dehydrogenase and proline permease, and its differential expression in response to osmotic stress". *J. Bacteriol.* **185**: 3842-3852.
- Leonard, L. T.,** 1943. "A simple assembly for use in testing of culture of rhizobia". *J. Bacteriol.* **45**: 523-527.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J. C. y Dénarié, J.,** 1990. "Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal". *Nature* **344**: 781-784.

- Leyer, G. J. y Johnson, E. A., 1993. "Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*". *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1842-1847.
- Lloret, J., Bolaños, L., Lucas, M. M., Peart, J. M., Brewin, N. J., Bonilla, I. y Rivilla, R., 1995. "Ionic stress and osmotic pressure induce different alterations in the lipopolysaccharide of a *Rhizobium meliloti* strain". *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3701-3704.
- López, M., Herrera-Cervera, J. A., Lluch, C. y Tejera, N. A., 2006. "Trehalose metabolism in root nodules of the model legume *Lotus japonicus* in response to salt stress". *Physiol. Plant.* **128**: 701-709.
- Lund, P. A., 2001. "Microbial molecular chaperones". *Adv. Microbial Physiol.* **44**: 93-140.
- Lynch, D., O'Brien, J., Welch, T., Clarke, P., Cuiv, P. O., Crosa, J. H. y O'Connell, M., 2001. "Genetic organization of the region encoding regulation, biosynthesis and transport of rhizobactin 1021, a siderophore produced by *Sinorhizobium meliloti*". *J. Bacteriol.* **183**: 2576-2585.
- Makihara, F., Tsuzuki, M., Sato, K., Masuda, S., Nagashima, K. V., Abo, M. y Okubo, A., 2005. "Role of trehalose synthesis pathways in salt tolerance mechanism of *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* IL106". *Arch. Microbiol.* **184**: 56-65.
- Mandon, K., Østerås, M., Boncompagni, E., Trinchant, J. C., Spennato, G., Poggi, M.-C. y LeRudulier, D., 2003. "The *Sinorhizobium meliloti* glycine betaine biosynthetic genes (*betICBA*) are induced by choline and highly expressed in bacteroids". *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**: 709-719.
- Martín-Galiano, A. J., Overweg, K., Ferrándiz, M. J., Reuter, M., Wells, J. M. y de la Campa, A. G., 2005. "Transcriptional analysis of the acid tolerance response in *Streptococcus pneumoniae*". *Microbiology* **151**: 3935-3946.
- Martínez-Morales, F., Schobert, M., López-Lara, I. M. y Geiger, O., 2003. "Pathways for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria". *Microbiology* **149**: 3461-3471.
- Maruta, K., Hattori, K., Nakada, T., Kubota, M., Sugimoto, T. y Kurimoto, M., 1996a. "Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Rhizobium* sp. M-11". *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**: 717-720.
- Maruta, K., Hattori, K., Nakada, T., Kubota, M., Sugimoto, T. y Kurimoto, M., 1996b. "Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Arthrobacter* sp. Q36". *Biochim. Biophys. Acta* **1289**: 10-13.

- McIntyre, H. J., Davies, H., Hore, D. T., Miller, S. H., Dufour, J.-P. y Ronson, C. W.,** 2007. "Trehalose biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in desiccation tolerance". *Appl. Env. Microbiol.* **73**: 3984-3992.
- McLaggan, D., Naprstek, J., Buurman, E. T. y Epstein, W.,** 1994. "Interdependence of K⁺ and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*". *J. Biol. Chem.* **269**: 1911-1917.
- Meade, H. M., Long, S. R., Ruvkun, G. B., Brown, S. E. y Ausube, F. M.,** 1982. "Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis". *J. Bacteriol.* **149**: 114-122.
- Mellor, R. B.,** 1992. "Is trehalose a symbiotic determinant in symbioses between higher plants and microorganisms?". *Symbiosis* **12**: 113-129.
- Meury, J.,** 1994. "Immediate and transient inhibition of the respiration of *Escherichia coli* under hyperosmotic shock". *FEMS Microbiol. Lett.* **121**: 281-286.
- Miller, J. H.,** 1972. "Experiments in molecular genetics". Cold Spring Harbor Laboratory, CHS. Nueva York, N.Y.
- Miller, K. J., Kennedy, E. P. y Reinold, V. N.,** 1986. "Osmotic adaptation by gram-negative bacteria: Possible role for periplasmic oligosaccharides". *Science* **231**: 48-51.
- Miller, K. J. y Wood, J. M.,** 1996. "Osmoadaptation by rhizosphere bacteria". *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 101-136.
- Miller-Williams, M., Loewen, P. C. y Oresnik, I. J.,** 2006. "Isolation of salt-sensitive mutants of *Sinorhizobium meliloti* strain Rm1021". *Microbiology* **152**: 2049-2059.
- Missiakas, D. y Raina, S.,** 1998. "The extracytoplasmic function sigma factors: Role and regulation". *Mol. Microbiol.* **28**: 1059-1066.
- Mithöfer, A., Bhagwat, A. A., Keister, D. L. y Ebel, J.,** 2001. "*Bradyrhizobium japonicum* mutants defective in cyclic β -glucan synthesis show enhanced sensitivity to plant defense responses". *Z. Naturforsch* **56**: 581-584.
- Mithöfer, A.,** 2002. "Suppression of plant defense in rhizobia-legume symbiosis". *Trends Plant Sci.* **7**: 440-444.
- Mogi, T., Yamamoto, H., Nakao, T., Yamato, I. y Anraku, Y.,** 1986. "Genetic and physical characterization of *putP*, the proline carrier gene of *Escherichia coli* K12". *Mol. Gen. Genet.* **202**: 35-41.
- Morbach, S. y Krämer, R.,** 2002. "Body shaping under water stress: Osmosensing and osmoregulation of solute transport in bacteria". *Chem. Bio. Chem.* **3**: 384-397.

- Morbach, S. y Krämer, R.**, 2005. "Structure and function of the betaine uptake system BetP of *Corynebacterium glutamicum*: strategies to sense osmotic and chill stress". *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 143-153.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B. y Boivin-Masson, C.**, 2001. "Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria". *Nature* **411**: 948-950.
- Müller, J., Xie, Z.-P., Staehelin, C., Boller, T. y Wiemken, A.**, 1994. "Effects of nitrate on accumulation of trehalose and other carbohydrates and on trehalase activity in soybean root nodules". *J. Plant Physiol.* **143**: 153-160.
- Müller, J., Boller, T. y Wiemken, A.**, 1996. "Pools of non-structural carbohydrates in soybean root nodules during water stress". *Physiol. Plant.* **98**: 723-730.
- Müller, J., Boller, T. y Wiemken, A.**, 1998. "Trehalose affects sucrose synthase and invertase activities in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) roots". *J. Plant Physiol.* **153**: 255-257.
- Müller, J., Boller, T. y Wiemken, A.**, 2001. "Trehalose becomes the most abundant non-structural carbohydrate during senescence of soybean nodules". *J. Exp. Botany* **52**: 943-947.
- Munro, G. F., Hercules, K., Morgan, J. y Sauerbier, W.**, 1972. "Dependence of putrescine content of *Escherichia coli* on the osmotic strength of the medium". *J. Biol. Chem.* **247**: 1272-1280.
- Nakahigashi, K., Kubo, N., Narita, S., Shimaoka, T., Goto, S., Oshima, T., Mori, H., Maeda, M., Wada, C. y Inokuchi, H.**, 2002. "HemK, a class of protein methyl transferase with similarity to DNA methyl transferases, methylates polypeptide chain release factors, and *hemK* knockout induces defects in translational termination". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 1473-1478.
- Nakao, T., Yamato, I. y Anraku, Y.**, 1988. "Mapping of the multiple regulatory sites for *putP* and *putA* expression in the *putC* region of *Escherichia coli*". *Mol. Gen. Genet.* **214**: 379-388.
- Neuhof, W., Fraek, M. L. y Beck, F. X.**, 2002. "Heat shock protein 72, a chaperone abundant in renal papilla, counteracts urea-mediated inhibition of enzymes". *Pluegers Arch.* **445**: 67-73.
- Nikaido, H.**, 2003. "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 593-656.
- Ninfa, A. J. y Atkinson, M. R.**, 2000. "PII signal transduction proteins". *Trends Microbiol.* **8**: 172-179.

- Nogales, J., Campos, R., BenAbdelkhalek, H., Olivares, J., Lluch, C. y Sanjuan, J.,** 2002. “*Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*”. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 225-232.
- Nogales, J., Muñoz, S., Olivares, J. y Sanjuán, J.,** 2006. “*Sinorhizobium meliloti* genes involved in tolerance to the antimicrobial peptide protamine”. *FEMS Microbiol. Lett.* **264**: 160-167.
- Ohwada, T. y Sagisaka, S.,** 1988. “The differential roles of potassium, proline, and betaine in osmoregulation of *Escherichia coli*”. *B. Agric. Biol. Chem.* **52**: 313-320.
- Oke, V., Rushing, B. G., Fisher, E. J., Moghadam-Tabrizi, M. y Long, S. R.,** 2001. “Identification of the heat-shock sigma factor RpoH and a second RpoH-like protein in *Sinorhizobium meliloti*”. *Microbiology* **147**: 2399-2408.
- Olivares, J., Casadesús, J. y Bedmar, E. J.,** 1980. “Method for testing degree of infectivity of *Rhizobium meliloti* strains”. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 967-970.
- Ono, Y., Mitsui, H., Sato, T. y Minamisawa, K.,** 2001. “Two RpoH homologs responsible for the expression of heat shock protein genes in *Sinorhizobium meliloti*”. *Mol. Gen. Genet.* **264**: 902-912.
- Oren, A., Heldal, M., Norland, S. y Galinski, E. A.,** 2002. “Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*”. *Extremophiles* **6**: 491-498.
- Orozco, M. C., Barraza, A., Wong, A., Suárez, R. e Iturriaga, G.,** 2006. “A *Rhizobium etli* mutant in trehalose-6-phosphate synthase gene is stress sensitive and affects plant growth”. En: Sánchez, F., Quinto, C., López-Lara, I. y Geiger, O., (eds.). “Biology of Plant-Microbe Interactions”. pp. 494-499. Society for Plant-Microbe Interactions. St. Paul, MN.
- Østerås, M., Boncompagni, E., Vincent, N., Poggi, M.-C. y LeRudulier, D.,** 1998. “Presence of a gene encoding choline sulfatase in *Sinorhizobium meliloti bet* operon: Choline-O-sulfate is metabolized into glycine betaine”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 11394-11399.
- Özcan, N., Krämer, R. y Morbach, S.,** 2005. “Chill activation of compatible solute transporters in *Corynebacterium glutamicum* at the level of transport activity”. *J. Bacteriol.* **187**: 4752-4759.
- Parra-Lopez, C., Baer, M. T. y Groisman, E. A.,** 1993. “Molecular genetic analysis of a locus required for resistance to antimicrobial peptides in *Salmonella typhimurium*”. *EMBO J.* **12**: 4053-4062.

- Perret, X., Staehelin, C. y Broughton, W. J.,** 2000. "Molecular basis of symbiotic promiscuity". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 180-201.
- Peter, H., Bader, A., Burkovski, A., Lambert, C. y Krämer, R.,** 1997. "Isolation of the *putP* gene of *Corynebacterium glutamicum* and characterization of a low-affinity uptake system for compatible solutes". *Arch. Microbiol.* **168**: 143-151.
- Phillips, D. A. y Streit, W. R.,** 1997. "Applying plant-microbe signalling concepts to alfalfa: Roles for secondary metabolites". En: McKersie, B. D. y Brown, D. C. W., (eds.), "Biotechnology and the improvement of forage legumes". pp. 319-342. CAB International, Wallingford, England.
- Pichereau, V., Pocard, J.-A., Hamelin, J., Blanco, C. y Bernard, T.,** 1998. "Differential effects of dimethylsulfoniopropionate, dimethylsulfonioacetate, and other S-methylated compounds on the growth of *Sinorhizobium meliloti* at low and high osmolarities". *Appl. Env. Microbiol.* **64**: 1420-1429.
- Pocard, J.-A., Bernard, T., Goas, G. y LeRudulier, D.,** 1984. "Partial restoration of nitrogen fixation activity by glycine betaine and proline betaine in young *Medicago sativa* L. plants under water stress". *C. R. Acad. Sci.* **298**: 477-480.
- Pocard, J.-A., Bernard, T., Smith, L. T. y LeRudulier, D.,** 1989. "Characterization of three choline transport activities in *Rhizobium meliloti*: Modulation by choline and osmotic stress". *J. Bacteriol.* **171**: 531-537.
- Pocard, J. A., Vincent, N., Boncompagni, E., Smith, L. T., Poggi, M.-C. y LeRudulier, D.,** 1997. "Molecular characterization of the *bet* genes encoding glycine betaine synthesis in *Sinorhizobium meliloti* 102F34". *Microbiology* **143**: 1369-1379.
- Poolman, B. y Glaasker E.,** 1998. "Regulation of compatible solute accumulation in bacteria". *Mol. Microbiol.* **29**: 397-407.
- Prentki, P. y Krisch, H. M.,** 1984. "In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment". *Gene* **29**: 303-312.
- Prior, B. A., Hewitt, E., Brandt, E. V., Clarke, A. y Mildenhall, J. P.,** 1994. "Growth, pectate lyase production and solute accumulation by *Erwinia chrysanthemi* under osmotic stress: Effect of osmoprotectants". *J. Appl. Bacteriol.* **77**: 433-439.
- Provorov, N.A.,** 2001. "Genetic-evolutionary basis of symbiosis doctrine". *Zh. Obshch Biol.* **62**: 472-495.
- Qu, Q., Lee, S. J. y Boss, W.,** 2004. "TreT, a novel trehalose glycosyltransfering synthase of the hyperthermophilic archeon *Thermococcus litoralis*". *J. Biol. Chem.* **279**: 47890-47897.

- Raivio, T. L. y Silhavy, T. J.**, 2001. "Periplasmic stress and ECF sigma factors". *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 591-624.
- Raivio, T. L.**, 2005. "Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis". *Mol. Microbiol.* **56**: 1119-1128.
- Record, M. T. Jr., Courtenay, E. S., Cayley, D. S. y Guttman, H. J.**, 1998a. "Responses of *E. coli* to osmotic stress: Large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water". *Trends Biochem. Sci.* **23**: 143-148.
- Record, M. T. Jr., Courtenay, E. S., Cayley, D. S. y Guttman, H. J.**, 1998b. "Biophysical compensation mechanisms buffering *E. coli* protein-nucleic acid interactions against changing environments". *Trends Biochem. Sci.* **23**: 190-194.
- Reuhs, B. L., Williams, M. N. V., Kim, J. S., Carlson, R. W. y Côté, F.**, 1995. "Suppression of the Fix⁻ phenotype of *Rhizobium meliloti* *exoB* mutants by *lpsZ* is correlated to a modified expression of the K polysaccharide". *J. Bacteriol.* **177**: 4289-4296.
- Rhoads, D. B. y Epstein, W.**, 1977. "Energy coupling to net K⁺-transport in *Escherichia coli* K-12". *J. Biol. Chem.* **252**: 1394-1401.
- Richards, A. B., Krakowka, S., Dexter, L. B., Schmid, H., Wolterbeek, A. P. M., Waalkens-Berendsen, D. H., Shigoyuki, A. y Kurimoto, M.**, 2002. "Trehalose: A review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies". *Food Chem. Toxicol.* **40**: 871-898.
- Rigaud, J. y Puppo, A.**, 1975. "Indole-3 acetic catabolism by soybean bacteroids". *J. Gen. Bacteriol.* **88**: 223-228.
- Rimmele, M. y Boos, W.**, 1994. "Trehalose-6-phosphate hydrolase of *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* **176**: 5654-5664.
- Roberts, M. F.**, 2000. "Osmoadaptation and osmoregulation in archaea". *Front Biosci.* **5**: 796-812.
- Robertsen, B. K., Aiman, P., Darwill, A. G., McNeil, M. y Albersheim, P.**, 1981. "The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*". *Plant Physiol.* **67**: 389-400.
- Rodríguez, R. L. y Tait, R. C.**, 1983. "Recombinant DNA techniques". Addison-Wesley Publishing.
- Roe, A. J., McLaggan, D., O'Byrne, C. P. y Booth, I. R.**, 2000. "Rapid inactivation of the *Escherichia coli* Kdp K⁺ uptake system by high potassium concentrations". *Mol. Microbiol.* **35**: 1235-1243.

- Roeßler, M. y Müller, V.**, 2001. "Osmoadaptation in bacteria and archaea: Common principles and differences". *Env. Microbiol.* **3**: 743-754.
- Rokenes, T. P., Lamark, T. y Strøm, A. R.**, 1996. "DNA-binding properties of the BetI repressor protein of *Escherichia coli*: The inducer choline stimulates BetI-DNA complex formation". *J. Bacteriol.* **178**: 1663-1670.
- Rüberg, S., Tian, Z-X., Krol, E., Linke, B., Meyer, F., Wang, Y., Pühler, A., Weidner, S. y Becker, A.**, 2003. "Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: Genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression". *J. Biotechnol.* **106**: 255-268.
- Russell, N. J., Evans, R. I., ter Steeg, P. F., Hellemons, J., Verheul, A. y Abee, T.**, 1995. "Membranes as a target for stress adaptation". *Int. J. Food Microbiol.* **28**: 255-261.
- Ryu, S. I., Park, C. S., Cha, J., Woo, E. J y Lee, S. B.**, 2005. "A novel trehalose-synthesizing glycosyltransferase from *Pyrococcus horikoshii*: Molecular cloning and characterization". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**: 429-436.
- Sage, A. E. y Vasil, M. L.**, 1997. "Osmoprotectant-dependent expression of *plcH*, encoding the hemolytic phospholipase C, is subject to novel catabolite repression control in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1". *J. Bacteriol.* **179**: 4874-4881.
- Sakaguchi, K.**, 1960. "Betaine as a growth factor for *Pediococcus soyae*. VII. Studies on the activities of bacteria in soy sauce brewing". *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.* **24**: 489-496.
- Sakuma, T., Yamada, N., Saito, H., Kakegawa, T. y Kobayashi, H.**, 1998. "pH dependence of the function of sodium ion extrusion systems in *Escherichia coli*". *Biochim. Biophys. Acta* **1363**: 231-237.
- Salminen, S. O. y Streeter, J. G.**, 1986. "Enzymes of α,α -trehalose metabolism in soybean nodules". *Plant Physiol.* **81**: 538-541.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T.**, 1989. "Molecular cloning. A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York, N.Y.
- Santos, R., Hérouart, D., Puppo, A. y Touati, D.**, 2000. "Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in *Rhizobium*-legume symbiosis". *Mol. Microbiol.* **38**: 750-759.
- Sarma, A. D. y Emerich, D. W.**, 2005. "Global protein expression pattern of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids: A prelude to functional proteomics" *Proteomics* **5**: 4170-4184.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. y Pühler, 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.
- Schiefner, A., Breed, J., Bösser, L., Kneip, S., Gade, J., Holtmann, G., Diederichs, K., Welte, W. y Bremer, E.**, 2004. "Cation- π interactions as determinants for binding of the compatible solutes glycine betaine and proline betaine by the periplasmic ligand-binding protein ProX from *Escherichia coli*". *J. Biol. Chem.* **279**: 5588-5596.
- Schiller, D., Kruse, D., Kneifel, H., Krämer, R. y Burkovski, A.**, 2000. "Polyamine transport and role of *potE* in response to osmotic stress in *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* **182**: 6247-6249.
- Schiraldi, Ch., Di Lernia, I. y De Rosa, M.**, 2002. "Trehalose production: Exploiting novel approaches". *Trends Biotechnol.* **20**: 420-425.
- Schlösser, A., Hamann, A., Bossemeyer, D., Schneider, E. y Bakker, E. P.**, 1993. "NAD⁺ binding to the *Escherichia coli* K⁺-uptake protein TrkA and sequence similarity between TrkA and domains of a family of dehydrogenases suggest a role for NAD⁺ in bacterial transport". *Mol. Microbiol.* **9**: 533-543.
- Schlösser, A., Meldorf, M. W., Stumpe, S., Bakker, E. P. y Epstein, W.**, 1995. "TrkH and its homolog, TrkG, determine the specificity and kinetics of cation transport by the Trk system of *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* **177**: 1908-1910.
- Schwan, W. R., Lehmann, L. y McCormick, J.**, 2006. "Transcriptional activation of the *Staphylococcus aureus putP* gene by low-proline-high osmotic conditions and during infection of mutine and human tissues". *Infect. Immun.* **74**: 399-409.
- Scott, D. B., Wilson, R., Shaw, G. J., Petit, A. y Tempe, J.**, 1987. "Biosynthesis and degradation of nodule-specific *Rhizobium loti* compounds in *Lotus* nodules". *J. Bacteriol.* **169**: 278-282.
- Serraj, R., Fleurat-Lessard, P., Jaillard, B. y Drevon, J. J.**, 1995. "Structural changes in the inner-cortex cells of soybean root-nodules are induced by short-term exposure to high salt or oxigen concentrations". *Plant Cell Environ.* **18**: 455-462.
- Shamseldin, A. y Werner, D.**, 2005. "High salt and high pH tolerance of new isolated *Rhizobium etli* strains from Egyptian soils". *Curr. Microbiol.* **50**: 11-16.
- Sharma, S. B. y Signer, E. R.**, 1990. "Temporal and spatial regulation of the symbiotic genes of *Rhizobium meliloti* in planta revealed by transposon Tn5-*gusA*". *Genes Dev.* **4**: 344-356.
- Sharypova, L. A., Yurgel, S. N., Keller, M., Simarov, B. V., Pühler, A. y Becker, A.**, 1999. "The *eff-482* locus of *Sinorhizobium meliloti* CXM1-105 that influences symbiotic

effectiveness consists of three genes encoding an endoglycanase, a transcriptional regulator and an adenylate cyclase". *Mol. Gen. Genet.* **261**: 1032-1044.

Simon, R., Priefer, U. y Pühler, A., 1983. "A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram negative bacteria". *Biotechnology* **1**: 784-791.

Sleator, R. D. y Hill, C., 2001. "Bacterial osmoadaptation: The role of osmolytes in bacterial stress and virulence". *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 49-71.

Smith, L. T., Pocard, J.-A., Bernard, T. y LeRudulier, D., 1988. "Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*". *J. Bacteriol.* **170**: 3142-3149.

Smith, L. T. y Smith, G. M., 1989. "An osmoregulated dipeptide in stressed *Rhizobium meliloti*". *J. Bacteriol.* **171**: 4714-4717.

Smith, L. T., Allaith, A. A. y Smith, G. M., 1994a. "Mechanism of osmotically regulated N-acetylglutaminylglutamine amide production in *Rhizobium meliloti*". *Plant Soil* **161**: 103-108.

Smith, L. T., Smith, G. M., D'Souza, M., Pocard, J.-A., LeRudulier, D. y Madkour, M. A., 1994b. "Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: Mechanism and control by other environmental signals". *J. Exp. Zool.* **268**: 162-165.

Smith, L. T., 1996. "Role of osmolytes in adaptation of osmotically stressed and chill-stressed *Listeria monocytogenes* grown in liquid media and on processed meat surfaces". *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3088-3093.

Soussi, M., Santamaría, M., Ocaña, A. y Lluch, C., 2001. "Effects of salinity on protein and lipopolysaccharide pattern in a salt-tolerant strain of *Mesorhizobium ciceri*". *J. Appl. Microbiol.* **90**: 476-481.

Southern, E. M., 1975. "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis". *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.

Soutourina, O. A. y Bertin, P. N., 2003. "Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria". *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 505-523.

Spiegelhalter, F. y Bremer, E., 1998. "Osmoregulation of the *opuE* proline transport gene from *Bacillus subtilis*: Contributions of the sigma A- and sigma B-dependent stress-responsive promoters". *Mol. Microbiol.* **29**: 285-296.

Streeter, J. G., 1980. "Carbohydrates in soybean nodules. II. Distribution of compounds in seedlings during the onset of nitrogen fixation". *Plant Physiol.* **66**: 471-476.

- Streeter, J. G.**, 1985. "Accumulation of α,α -trehalose by *Rhizobium* bacteria and bacteroids". *J. Bacteriol.* **164**: 78-84.
- Streeter, J. G.**, 1987. "Carbohydrate, organic acid, and amino acid composition of bacteroids and cytosol from soybean nodules". *Plant Physiol.* **85**: 768-773.
- Streeter, J. G. y Bhagwat, A.**, 1999. "Biosynthesis of trehalose from maltooligosaccharides in Rhizobia". *Can. J. Microbiol.* **45**: 716-721.
- Streeter, J. G. y Gómez, M. L.**, 2006. "Three enzymes for trehalose synthesis in *Bradyrhizobium* cultured bacteria and bacteroids from soybean nodules". *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 4250-4255.
- Streit, W. R., Schmitz, R. A., Perret, X., Staehelin, C., Deakin, W. J., Raasch, C., Liesegang, H. y Broughton, W. J.**, 2004. "An evolutionary hot spot: The pNGR234b replicon of *Rhizobium* sp. strain NGR234". *J. Bacteriol.* **186**: 535-542.
- Strøm, A. R. y Kaasen, I.**, 1993. "Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: Stress protection and stress regulation of gene expression". *Mol. Microbiol.* **8**: 205-210
- Stumpe, S., Schlösser, A., Schleyer, M. y Bakker, E. P.**, 1996. "K⁺ circulation across the prokaryotic cell membrane: K⁺-uptake systems". En: Konings, W. N., Kaback, H. R. y Lolkema, J. S., (eds.), "Transport Processes in Eukaryotic and Prokaryotic Organisms". pp. 473-499, Amsterdam, Elsevier.
- Suárez, R., Barraza, A., Wong, A., Orozco, M. C., Cevallos, M. A., Lara, M., Ramírez, M., Hernández, G. e Iturriaga, G.**, 2007. "The mutation and overexpression of trehalose-6-phosphate synthase in *Rhizobium etli-Phaseolus vulgaris* symbiosis affect grain yield and drought tolerance". Comunicación presentada en el "XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions". Sorrento, Italy.
- Sugiura, A., Hirokawa, K., Nakashima, K. y Mizuno, T.**, 1994. "Signal-sensing mechanisms of the putative osmosensor KdpD in *Escherichia coli*". *Mol. Microbiol.* **14**: 929-938.
- Sunda, W., Kieber, D. J., Kiene, R. P. y Huntsman, S.**, 2002. "An antioxidant function for DMSP and DMS in marine algae". *Nature* **418**: 317-320.
- Sutton, G. C., Russell, N. J. y Quinn, P. J.**, 1991. "The effect of salinity on the phase behaviour of total lipid extracts and binary mixtures of the major phospholipids isolated from a moderately halophilic eubacterium". *Biochim. Biophys. Acta* **1061**: 235-246.
- Svensäter, G., Sjögren, B. y Hamilton, I. R.**, 2000. "Multiple stress responses in *Streptococcus mutans* and the induction of general and stress-specific proteins". *Microbiology* **146**: 107-117.

- Talibart, R., Jebbar, M., Gouesbet, G., Himdi-Kabbab, S., Wroblewski, H., Blanco, C. y Bernard, T.**, 1994. "Osmoadaptation in rhizobia: Ectoine-induced salt tolerance". *J. Bacteriol.* **176**: 5210-5217.
- Talibart, R., Jebbar, M., Gouffi, K., Pichereau, V., Gouesbet, G., Blanco, C., Bernard, T. y Pocard, J.**, 1997. "Transient accumulation of glycine betaine and dynamics of endogenous osmolytes in salt-stressed cultures of *Sinorhizobium meliloti*". *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4657-4663.
- Trchounian, A.**, 1997. "Ion exchange in facultative anaerobes: Does a proton-potassium pump exist in anaerobic *Escherichia coli*?" *Anaerobe* **3**: 355-371.
- Trchounian, A. y Kobayashi, H.**, 1999. "Kup is the major K⁺ uptake system in *Escherichia coli* upon hyper-osmotic stress at a low pH". *FEBS Lett.* **447**: 144-148.
- Trchounian, A. y Kobayashi, H.**, 2000. "K⁺ uptake by fermenting *Escherichia coli* cells: pH dependent mode of the TrkA system operating". *Bioscience Reports* **20**: 277-288.
- Trinchant, J. C., Boscari, A., Spennato, G., Van de Sype, G. y LeRudulier, D.**, 2004. "Proline betaine accumulation and metabolism in alfalfa plants under sodium chloride stress. Exploring its compartmentalization in nodules". *Plant Physiol.* **135**: 1583-1594.
- Tsusaki, K., Nishimoto, T., Nakada, T., Kubota, M., Chaen, H., Sugimoto, T. y Kurimoto, M.**, 1996. "Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from *Pimelobacter* sp. R48". *Biochim Biophys. Acta* **1290**: 1-3.
- Tsusaki, K., Nishimoto, T., Nakada, T., Kubota, M., Chaen, H., Fukuda, S., Sugimoto, T. y Kurimoto, M.**, 1997. "Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from *Thermus aquaticus* ATCC 33923". *Biochim. Biophys. Acta* **1334**: 28-32.
- Tu, J.C.**, 1981. "Effect of salinity on *Rhizobium* root hair interaction, nodulation and growth of soybean". *Can. J. Plant Sci.* **61**: 231-239.
- Tzvetkov, M., Klepprogge, C., Zelder, O. y Liebl, W.**, 2003. "Genetic dissection of trehalose biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: Inactivation of trehalose production leads to impaired growth and an altered cell wall lipid composition" *Microbiology* **149**: 1659-1673.
- Van der Laan, M., Gassel, M. y Altendorf, K.**, 2002. "Characterization of amino acid substitutions in KdpA, the K⁺-binding and -translocating subunit of the KdpFABC complex of *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* **184**: 5491-5494.
- Vasse, J., de Billy, J., Camut, S. y Truchet, G.**, 1990. "Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules". *J. Bacteriol.* **172**: 4295-4306.

- Vinés, E. D., Marolda, C. L., Balachandran, A. y Valvano, M. A., 2005. "Defective O-Antigen polymerization in *tolA* and *pal* mutants of *Escherichia coli* in response to extracytoplasmic stress". *J. Bacteriol.* **187**: 3359-3368.
- Wannet, W. J. B., Op den Camp, H. J. M., Wisselink, H. W., Van der Drift, C., Van Griensven L. J. L. D. y Vogels, G. D., 1998. "Purification and characterization of trehalose phosphorylase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus*". *Biochim. Biophys. Acta* **1425**: 177-188.
- Weber, A. y Jung, K., 2002. "Profiling early osmostress-dependent gene expression in *Escherichia coli* using DNA macroarrays". *J. Bacteriol.* **184**: 5502-5507.
- Wei, W., Jiang, J., Li, W., Wang, L. y Yang, S. S., 2004. "Isolation of salt-sensitive mutants from *Sinorhizobium meliloti* and characterization of genes involved in salt tolerance". *Lett. Appl. Microbiol.* **39**: 278-283.
- Welsh, D. T., Reed, R. H. y Herbert, R. A., 1991. "The role of trehalose in the osmoadaptation of *Escherichia coli* NCIB 9484: Interaction of trehalose, K⁺ and glutamate during osmoadaptation in continuous cultures". *J. Gen. Microbiol.* **137**: 745-750.
- Welsh, D. T., 2000. "Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: From single cells to global climate". *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 263-290.
- Whatmore, A. M. y Reed, R. H., 1990. "Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: A possible role for K⁺ in turgor regulation". *J. Gen. Microbiol.* **136**: 2521-2526.
- Widmer, F., Shaffer, B. T., Porteous, L. A. y Seidler, R. J., 1999. "Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site en the Oregon cascade mountain range". *Appl. Env. Microbiol.* **65**: 374-380.
- Wiedermann, G. y Müller, P., 2004. "Use of TnKPK2 for sequencing a 10,6-kb *PstI* DNA fragment of *Bradyrhizobium japonicum* and for the construction of *aspA* and *ndvA* mutants". *Arch. Microbiol.* **181**: 418-427.
- Willis, L. B. y Walker, G. C., 1999. "A novel *Sinorhizobium meliloti* operon encodes an α -glucosidase and a periplasmic-binding-protein-dependent transport system for α -glucosides". *J. Bacteriol.* **181**: 4176-4184.
- Wolf, A., Krämer, R. y Morbach, S., 2003. "Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and their significance in response to osmotic stress". *Mol. Microbiol.* **49**: 1119-1134.
- Wood, J. M., 1988. "Proline porters affect the utilization of proline as nutrient or osmoprotectant for bacteria". *J. Membr. Biol.* **106**: 183-202.

- Wood, J. M., 1999. "Osmosensing by bacteria: Signals and membrane-based sensors". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 230-262.
- Wood, J. M., Bremer, E., Csonka, L. N., Kraemer, R., Poolman, B., van der Heide, T. y Smith, L. T., 2001. "Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria". *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* **130**: 437-460.
- Wood, K. V., Stringham, K. J., Smith, D. L., Volenec, J. J., Hendershot, K. L., Jackson, K. A., Rich, P. J., Yang, W.-J. y Rhodes, D., 1991. "Betaines of alfalfa". *Plant Physiol.* **96**: 892-897.
- Worning, P., Jensen, L. J. y Nelson, K. E., 2000. "Structural analysis of DNA sequence: Evidence for lateral gene transfer in *Thermotoga maritima*". *Nucl. Acids Res.* **28**: 706-709.
- Xia, B., Ke, H., Shinde, U. y Unouye, M., 2003. "The role of RbfA in 16S rRNA processing and cell growth at low temperature in *Escherichia coli*". *J. Mol. Biol.* **332**: 575-584.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J., 1985. "Improved M13 phage cloning vectors and strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors". *Gene* **33**: 103-119.
- Yap, S. F. y Lim, S. T., 1983. "Response of *Rhizobium* sp. UMKL 20 to sodium chloride stress". *Arch. Microbiol.* **135**: 224-228.
- Yoon, S. H., Han, M. J., Lee, S. Y., Jeong, K. J. y Yoo, J. S., 2003. "Combined transcriptome and proteome analysis of *Escherichia coli* during high cell density culture". *Biotechnol. Bioeng.* **81**: 753-767.
- York, G. M. y Walker, G. C., 1998. "The succinyl and acetyl modifications of succinoglycan influence susceptibility of succinoglycan to cleavage by the *Rhizobium meliloti* glycanases ExoK and ExsH". *J. Bacteriol.* **180**: 4184-4191.
- Young, J. P. W., Crossman, L. C., Johnston, W. B., Thomson, N. R., Ghazoui, Z. F., Hull, K. H., Wexler, M., Curson, A. R. J., Todd, J. D., Poole, P. S., Mauchline, T. H., East, A. K., Quail, M. A., Churcher, C., Arrowsmith, C., Cherevach, I., Chillingworth, T., Clarke, K., Cronin, A., Davis, P., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Norbertczak, H., Rabinowitsch, E., Sanders, M., Simmonds, M., Whitehead, S y Parkhill, J., 2006. "The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components". *Genome Biol.* **7**: R34.
- Zahran, H. H. y Sprent, J. I., 1986. "Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plant by *Rhizobium leguminosarum*". *Planta* **167**: 303-309.

- Zahran, H. H.**, 1999. “*Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate”. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 968-989.
- Zakharyan, E. y Trchounian, A.**, 2001. “K⁺ influx by Kup in *Escherichia coli* is accompanied by a decrease in H⁺ efflux”. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**: 61-64.
- Zehr, J. P., Jenkins, B. D., Short, S. M. y Steward, G. F.**, 2003. “Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A cross-system comparison”. *Env. Microbiol.* **5**: 539-554.
- Zhou, M., Tucker, T. C., Pessaraki, M. y Cepeda, J. A.**, 1992. “Nitrogen fixation by alfalfa with two substrate nitrogen levels under sodium chloride stress”. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **56**: 1500-1504.
- Zolkiewski, M.**, 1999. “ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation”. *J. Biol. Chem.* **274**: 28083-28086.