

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA
CENTRO HISPANOLUSO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**



**ANÁLISIS MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LA
CELULASA CelC2 EN LA SIMBIOSIS RHIZOBIA-
LEGUMINOSAS**

MARTA ROBLEDO GARRIDO
TESIS DOCTORAL
2010

La imagen principal de la portada muestra una raíz de trébol teñida de rojo con Ioduro de Propidio e inoculada con bacterias de la especie *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* transformadas de forma que expresan una proteína verde fluorescente. Estos microorganismos se encuentran principalmente en el interior de un nódulo que la planta ha desarrollado para albergarlos, y así permitirles llevar a cabo la simbiosis fijadora de nitrógeno, de gran importancia para la agricultura y el medio ambiente. La fotografía ha sido tomada mediante un microscopio confocal, que permite obtener secciones de distintos planos a diferentes profundidades y superponerlas de manera que se forme una imagen tridimensional.

También en la portada está representada la estructura de una celulasa, proteína que se encarga de romper las moléculas que forman la celulosa (representada en rojo).

En la contraportada aparecen dos fotografías tomadas mediante microscopía electrónica de barrido, técnica que usa una corriente de electrones en lugar de luz para visualizar las imágenes, de forma que aumenta el poder de resolución permitiendo que podamos ver detalles muy pequeños, pero en blanco y negro.

En la imagen superior aparece una bacteria de la especie *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* que ha conseguido colonizar una planta emitiendo unas finas y alargadas microfibrillas de celulosa.

En la imagen inferior está representado un pelo radical de trébol cuyo extremo, compuesto de celulosa, ha sido horadado por la celulasa que producen estas bacterias para entrar en el interior de la planta.

Todas las fotografías han sido tomadas durante la realización de este trabajo.

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA
CENTRO HISPANOLUSO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

**ANÁLISIS MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LA CELULASA
CelC2 EN LA SIMBIOSIS RHIZOBIA-LEGUMINOSAS**

**Memoria presentada por
MARTA ROBLEDO GARRIDO
para optar al
GRADO de DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES**

Fdo. Marta Robledo Garrido

D. PEDRO F. MATEOS GONZÁLEZ, PROFESOR TITULAR DE MICROBIOLOGÍA, Y D. EUSTOQUIO MARTÍNEZ MOLINA, CATEDRÁTICO DE MICROBIOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

AUTORIZAN:

Que la Memoria titulada: “ANÁLISIS MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LA CELULASA CelC2 EN LA SIMBIOSIS RHIZOBIA-LEGUMINOSAS”, elaborada por Marta Robledo Garrido y realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, sea presentada para optar al Grado de Doctor.

Y para que conste, extendemos la presente autorización en Salamanca, a 25 de Octubre de 2010

Fdo. Dr. D. Pedro F. Mateos González Fdo. Dr. D. Eustoquio Martínez Molina

**D. ÁNGEL DOMÍNGUEZ OLAVARRI, DIRECTOR DEL
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

AUTORIZA:

Que la memoria titulada: “ANÁLISIS MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LA CELULASA CelC2 EN LA SIMBIOSIS RHIZOBIA-LEGUMINOSAS” presentada por Dña. Marta Robledo Garrido para optar al Grado de Doctor, ha sido realizada bajo la dirección de los doctores D. Pedro F. Mateos González y D. Eustoquio Martínez Molina en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para que conste, autorizo su presentación en Salamanca, a de
de 2010.

Fdo. Dr. D. Ángel Domínguez Olavarri

AGRADECIMIENTOS

Acknowledgements

Me gustaría agradecer a todas las personas que de una u otra manera han contribuido a que este trabajo haya sido realizado:

Al Dr. D. Pedro F. Mateos González, director de la tesis, por su apoyo incansable e incondicional, su dedicación y disponibilidad, su confianza, su generosidad, su optimismo y por enseñarme tantas cosas... Gracias.

Al Dr. D. Eustoquio Martínez Molina, codirector del trabajo, por su orientación y estímulo y por confiar en mí desde el primer día, haciéndome sopesar los pros y contras antes de embarcarme en esta profesión. Espero (y creo) haber escogido el camino correcto... Gracias.

A la Dra. Dña. Encarnación Velázquez Pérez, por su constante disponibilidad y por sus consejos y opiniones sobre los experimentos, que la han convertido en la tercera directora de este trabajo... Gracias.

Al Dr. D. José Ignacio Jiménez Zurdo, por su inestimable ayuda para la realización de esta tesis, por su sensata orientación, su disponibilidad y por darme la oportunidad de trabajar en la Estación Experimental del Zaidín de Granada donde pude aprender varios métodos de biología molecular y vivir una experiencia muy gratificante... Gracias.

A la Dra. Dña. María José Soto Missfut, por su colaboración durante mi estancia en el Zaidín, por su paciencia y atención, y por todos los consejos que me ha dado ... Gracias

I would like to sincerely thank Dra. Ann Hirsch for giving me the opportunity to travel to California to work in biofilms. For her guidance, understanding, and her support and constant attention when I had the accident.... Thanks.

I would also like to thank Dr. Giles Oldroyd for giving me the opportunity to work in "the plant side" at John Innes Centre. For his assistance and guidance during my stay there and for travelling to Salamanca again to be part of my board of examiners... Thanks.

I am very grateful to Dr. D. Frank Dazzo for his contribution to the work from the U.S.A. and for his thoughtful suggestions, and to Dr. Andrea Squartini and Dr. Peter Mergaert for writing the reports I need to obtain the "European Doctorate Mention" ... Thanks.

Al Dr. D. Andrés Chordi Cobo, por ser un ejemplo para todos, por su amabilidad y su cercanía... Gracias.

Me gustaría agradecer especialmente a mis amigos y compañeros de laboratorio del CIALE y el Edificio Departamental de Salamanca, que forman parte de mi familia científica y sin los que este trabajo no sería lo mismo. A Helena por su generosidad, por la paciencia que tuvo conmigo al principio pese a estar preparando su Tesis, por ayudarme con mis experimentos y por enseñarme un montón de cosas para ser una buena microbióloga (o bacterióloga, como ella). A Esther y a Lina por su compañía y ayuda en los momentos en los que la he necesitado y por sus ánimos y su paciencia y comprensión durante mis ausencias. Espero que sigamos abriendo nuevas líneas, continuando con éxito las que ya han comenzado y cerrando muchas más casetas juntas y os deseo toda la suerte del mundo en el resto de vuestras tesis. A (las doctoras) Paula y Lorena por encontrar siempre un momento para ayudarme, por su agradable compañía y por tener siempre una sonrisa. A Pablo, Pilar, Raúl Rodríguez y Eugenia por vuestra compañía y vuestro apoyo. A Raúl Rivas y a Martha Trujillo por su cercanía y sus buenos consejos. A todos por los buenos tiempos vividos dentro y fuera del laboratorio, incluso cuando las preocupaciones frecuentes de este trabajo que hemos escogido, no me han permitido estar de mejor humor... Gracias.

A los demás compañeros de Farmacia del departamental, a los que compartieron tanto tiempo y tantos buenos momentos conmigo también el laboratorio 205: a Pilar, Teresa, Mamen, Ricardo y Chus (gracias por el CD). A la Dra. Nieves Vizcaíno y a Ana por estar siempre dispuestas a dejarnos lo que necesitáramos. Y a Rebeca e Ilanit del 208/ laboratorio 2, por tantas tardes de parloteo ... Gracias.

A mis compañeros del grupo de Genética/L1. A Choni por su paciencia, su apoyo sus consejos y su ayuda con las clonaciones y el confocal; al Dr. D. José María Díaz Minguéz y a Brisa que nos ayudaron en el comienzo de este trabajo, a José y a Raúl por encontrar siempre el momento para resolverme dudas y prestarme todo lo que pudiera necesitar ... Gracias.

A todos los compañeros y amigos que conocí en el Zaidín, porque la experiencia allí vivida es el mejor de los resultados de este trabajo. A Gloria, mi Thelma, por brindarme su amistad desde "el minuto 0" y acompañar a Louise en mil aventuras, por ser tan especial y por tantas cosas que se me acabarían los folios. A Ali por enseñarme otra manera de vivir y ver las cosas y por pasarme varios protocolos (estoy en deuda contigo, pero creo que te la pagaré con creces). A Roke por sus explicaciones, por hacerme un hueco en Granada y por mostrarme la ciudad y sus encantos. A Lola y a Rafa por su infinita paciencia y generosidad y el gran apoyo técnico. A Omar, el zaidinero que más sabe de RNA, y a Jose Antonio por su ayuda, su amistad y los buenos ratos en los congresos. A Antonio, a Paco, a Fernando y a Manolo por sus consejos y las discusiones sobre las celulasas. A Sensi, la técnico de laboratorio con más arte que conoceré y a Tita por su ayuda y su alegría. A Virgi, Carol y Quina del laboratorio de María José Soto por su colaboración durante mis visitas. Y a los Drs. D. Nicolás Toro y D. José Olivares por permitirme trabajar en sus respectivos grupos... Gracias.

I would also like to gratefully thank Nancy, Peter and all of the members of the Hirsch research group for giving me the support I need to complete my work there, especially after “Loco” last ride. I would also like to thank Tom, Stephanie, Stephan, Audra, Antonio, Laura, Clara, Ayup, Aisha and all the people that contribute to make my stay in Los Angeles one of the best experiences in my life... Thanks.

Additionally, I am very grateful for the friendship and support of all of the members of Giles Oldroyd research group, especially Ward Capoen, with whom I worked closely and puzzled over many problems. Thanks to Enrico, Myriam, Sybille, Dian, Ben, Giulia and Tatiana for finding always the moment to help me and, most importantly, for their friendship. Also to Grant Calder for his help with microcopy. And thanks to Robert, Thomas, Christine, Vincent, Jordi and Simone who also provided me some much needed humor and entertainment during my stay at JIC.

También quiero agradecer a todos los amigos que conocí fuera y dentro del John Innes Centre durante mi estancia en Norwich por hacerla inolvidable, especialmente a Yoselin y a Silvia por ser un rayo de luz en la gris Inglaterra... Gracias.

Y a mis profesores y compañeros de los cursos de Doctorado por compartir las ilusiones del comienzo de esta carrera y a todos los amigos y compañeros que también forman parte de la asociación de Investigadores NO Valorados (INNOVA- Salamanca) y la Federación de Jóvenes Investigadores, especialmente a Marisa, Victoria, Tere, Rodri y Ceci, por luchar conmigo para conseguir tirar alguno de los obstáculos que por desgracia tiene la carrera científica en España... Gracias.

Gracias a todas las personas que han colaborado directamente con su trabajo: a Álvaro Peix por su ayuda con los papers y el nitrógeno, a Susana, Inma e Isabel, por su apoyo técnico; a Tomás por su inestimable colaboración en el invernadero; a Miguel Ángel y a Araceli por su apoyo administrativo y a Conchi, Manoli, Margarita y a todas las personas que hacen que todo vaya mejor en el CIALE. Gracias también a Manolo del Servicio de secuenciación y a Teresa y Vero del Servicio de Patología Diagnóstica por ayudarme con vuestro trabajo. A todos por los buenos ratos compartidos, de esos que te ayudan a desconectar del trabajo... Gracias.

El presente trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia a través de los proyectos AGL 2005-07796 y 2008-03350 y de una Beca de Formación Profesional Universitario así como por la Junta de Castilla y León a través de una Beca de Formación de Personal Investigador. Por ello quiero manifestar mi más sincero agradecimiento.

Por último, y no menos importante, quiero agradecer a todos mis amigos de Cantabria, Salamanca, León, Asturias, Granada, Madrid, Barcelona, Tenerife... y del resto del mundo que he ido conociendo a lo largo de mi itinerante vida y con los que siempre puedo contar cuando desconecto del trabajo. A Rebe por ser una de las mejores personas que conozco y por seguirme a Norwich y allá donde vaya; a Bea y Aída por compartir conmigo tantos y tantos buenos momentos desde el comienzo de mi tesis; y a Nuria, Mary, “Fibi” y Belén, mis niñas de la uni, por tantas aventuras (cómo os echo de menos!)... A todos por estar siempre ahí, aunque muchos en la distancia... Gracias.

A Mario, por aparecer de repente en el momento más caótico de mi vida y permanecer a mi lado incondicionalmente, aportándome todo lo que necesito: una sonrisa cuando estoy triste, tranquilidad para calmar mis nervios, toda la compañía del mundo para no sentirme nunca sola, todo el cariño para hacerme feliz... y, pese a todo, seguir pensando que no tengo nada que agradecerle... Gracias.

A mi familia, a la que va dedicado este trabajo. A mi madre por ser mi ejemplo a seguir en la vida y por apoyarme siempre en todo lo que hago pese a que eso suponga estar lejos. A mi hermana y a mi padre, por darme ánimos en todo momento. A mis abuelos de aquí y a los que ya no están, sé que también estarían orgullosos de mí. Y a mis tíos, primos y demás allegados porque aunque se dice que a la familia no la eliges, yo lo hubiera hecho.... Gracias.

NADA. Cuando pierdes la consciencia no sientes nada.

Ni dolor, ni miedo, ni tristeza. NADA.

Y después, cuando vuelves a la vida, dudas. *What had happened? Am I alive?*

Y comienzas a sentir; dolor, miedo, angustia.

Cristales, sirenas, luces. *You will be ok. Please, don't move!*

Y comienzas a temblar.

Frío, chatarra, ruido. *What had happened? Can I walk?*

Y comienzas a pensar.

Vida, familia, amigos. *No, lady. Just wait, we are trying to help you.*

Y entonces te juras a ti misma que si todo sale bien, aprovecharás más aún cada minuto de tu vida.

Agujas, guantes, sábanas. *What's your name? How old are you? Where are you from?*

Y entonces intentas recordar, salir de tu letargo.

Rabia, llanto, ira. *Marta. 25. From Spain.*

Y comienzas a ver la luz al final del túnel, o del escáner.

Batas, folios, cables. *We will take care of you, please relax.*

Y comienzas a respirar, a sentir.

Bomberos, policías, enfermeros,

Y mientras esperas a que los médicos te den los resultados, sientes la mayor felicidad del mundo cuando comienzas a mover los dedos, los brazos y piernas y sientes el contacto de las sábanas.

Everything is ok, you will be recovered in a few days.

Lágrimas, risas, caricias.

Y sientes que vuelves a nacer, que tu vida sigue su camino...

Este mensaje lo escribí hace dos años tras un accidente de coche en Los Ángeles... de cada experiencia hay que intentar sacar algo positivo, y yo de esta aprendí la mejor lección de mi vida: que "Carpe diem" es algo más que una frase bonita y que hay que disfrutar de cada momento porque en cualquier instante, en cualquier parte del mundo, podemos perderla.

Este es mi pequeño gran secreto que os brindo a todos en agradecimiento, espero que podáis cumplirlo.

A mi familia

*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y
la energía atómica: la voluntad.”*
(Albert Einstein)

ÍNDICES



1. ÍNDICE DE MATERIAS

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. La fijación biológica de Nitrógeno..... | 3 |
| 1.1. Importancia ecológica y económica..... | 3 |
| 1.2. Microorganismos fijadores de nitrógeno | 6 |
| 2. Los rizobios..... | 7 |
| 2.1. Taxonomía de los rizobios | 7 |
| 2.2. Familia <i>Rhizobiaceae</i> | 10 |
| 2.2.1. El género <i>Rhizobium</i> | 11 |
| 2.2.2. El género <i>Sinorhizobium (Ensifer)</i> | 12 |
| 3. Las leguminosas..... | 13 |
| 3.1. El Género <i>Trifolium</i> | 15 |
| 3.2. El Género <i>Medicago</i> | 16 |
| 4. Proceso de infección <i>Rhizobium</i>-leguminosa | 17 |
| 4.1. Proceso de infección “canónico” por pelos radicales | 18 |
| 4.1.1. Intercambio de señales moleculares..... | 19 |
| 4.1.2. Adhesión de la bacteria a los pelos radicales..... | 21 |
| 4.1.3. Curvatura y degradación de la punta pelo radical (Infección primaria)..... | 23 |
| 4.1.4. Formación y desarrollo del canal de infección | 24 |
| 4.1.5. Liberación de las bacterias en el nódulo y formación del simbiosoma (Infección secundaria). | 25 |
| 4.1.6. Diferenciación en bacteroides fijadores de nitrógeno | 27 |
| 4.2. Otras vías de infección..... | 28 |
| 4.2.1. Entrada a través de grietas (“cracks”). | 28 |
| 4.2.2. Entrada a través de espacios intercelulares | 29 |
| 4.3. Respuestas de defensa identificadas durante el proceso | 29 |
| 4.3.1. Producción de ácido salicílico (SA)..... | 30 |
| 4.3.2. Acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS)..... | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 5. Implicación de enzimas degradativos de la pared celular vegetal en la infección..... | 31 |
| 5.1. Entrada de <i>Rhizobium</i> en la planta. ¿Degradación o invaginación de la pared celular? | 31 |
| 5.2. Producción de celulasas y pectinasas en los rizobios | 33 |
| 5.3. Detección de las celulasas producidas por <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii | 34 |
| 5.4. Caracterización <i>in vitro</i> de la celulasa CelC2: el fenotipo Hot | 36 |
| OBJETIVOS..... | 39 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 43 |
| 1. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS | 45 |
| 1.1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio | 45 |
| 1.1.1. Cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii | 45 |
| 1.1.2. Cepas de <i>Sinorhizobium meliloti</i> | 46 |
| 1.1.3. Otras cepas de microorganismos que nodulan leguminosas | 46 |
| 1.1.4. Cepas de <i>Escherichia coli</i> | 48 |
| 1.2. Condiciones de cultivo | 48 |
| 1.2.1. Medios utilizados | 48 |
| 1.2.2. Antibióticos empleados | 51 |
| 1.2.3. Manipulación y conservación de las cepas..... | 52 |
| 1.3. Plásmidos y vectores de clonaje | 52 |
| 1.4. Métodos de transformación en bacterias | 55 |
| 1.4.1. Transformación de <i>E. coli</i> | 55 |
| 1.4.2. Transformación de <i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii | 57 |
| 2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR..... | 58 |
| 2.1. Aislamiento de ácidos nucleicos | 58 |
| 2.1.1. Extracción de ADN plasmídico..... | 58 |
| 2.1.2. Extracción de ADN cromosómico total | 60 |
| 2.1.3. Extracción de ARN total | 61 |
| 2.1.4. Determinación de la concentración y pureza de ADN y ARN..... | 62 |
| 2.2. Manipulación y amplificación de ADN..... | 63 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa..... | 63 |
| 2.2.2. Oligonucleótidos cebadores empleados | 65 |
| 2.2.3. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción | 68 |
| 2.2.4. Tratamiento de extremos..... | 68 |
| 2.2.5. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación.. | 69 |
| 2.2.6. Electroforesis de fragmentos de ADN en geles de agarosa | 69 |
| 2.2.7. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa. | 70 |
| 2.2.8. Secuenciación de ADN | 71 |
| 2.3. Técnicas de hibridación de ADN-ADN (“Southern Blot”)..... | 71 |
| 2.3.1. Marcaje no radiactivo de sondas de ADN..... | 71 |
| 2.3.2. Hibridación de ADN | 71 |
| 2.4. RT-PCR..... | 73 |
| 3. TÉCNICAS ANALÍTICAS..... | 74 |
| 3.1. Obtención de extractos celulares..... | 74 |
| 3.2. Determinación del contenido en proteínas..... | 74 |
| 3.3. Ensayos de detección de actividad celulolítica | 75 |
| 3.3.1. Detección en cultivo celular..... | 75 |
| 3.3.2. Detección en extractos celulares por difusión radial en placa | 76 |
| 3.3.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)..... | 76 |
| 3.3.4. Cuantificación de la actividad celulolítica | 79 |
| 3.4. Purificación de la proteína CelC2 | 80 |
| 3.5. Determinación de la producción de celulosa | 82 |
| 3.5.1. Ensayos utilizando colorantes..... | 82 |
| 3.5.2. Ensayos de floculación y tratamiento con celulasas de los agregados | 83 |
| 3.6. Determinación de la formación de biofilms <i>in vitro</i> | 83 |
| 3.6.1. Ensayos en placas de microtitulación de poliestireno..... | 84 |
| 3.6.2. Ensayos en placas de PVC | 85 |
| 3.6.3. Ensayos en placas Costar con arena como sustrato | 85 |
| 4. ENSAYOS CON PLANTAS | 86 |
| 4.1. Semillas utilizadas en este estudio | 86 |
| 4.2. Medios de cultivo utilizados | 86 |
| 4.3. Esterilización y germinación de las semillas | 88 |
| 4.4. Ensayos <i>in vitro</i> a cortos periodos de tiempo..... | 88 |

| | |
|---|------------|
| 4.4.1. Ensayos de infectividad..... | 88 |
| 4.4.2. Medida de los pulsos de Ca ²⁺ | 89 |
| 4.4.3. Análisis de la expresión de nodulinas tempranas | 90 |
| 4.4.4. Ensayos de respuesta de defensa en la planta..... | 91 |
| 4.4.5. Ensayos de formación de biofilms <i>in planta</i> | 93 |
| 4.5. Cultivo de plantas | 94 |
| 4.5.1. Ensayos de nodulación en cultivo monoxénico | 94 |
| 4.5.2. Ensayos de producción vegetal con leguminosas..... | 95 |
| 4.5.3. Ensayos de tumorigénesis en plantas de tomate y tabaco | 95 |
| 4.6. Ensayos post- cultivo..... | 96 |
| 4.6.1. Procesado de los nódulos | 96 |
| 4.6.2. Procesado de las plantas..... | 98 |
| 5. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA..... | 98 |
| 5.1. Microscopía óptica | 98 |
| 5.2. Microscopía de fluorescencia | 98 |
| 5.3. Microscopía confocal | 99 |
| 5.4. Microscopía electrónica..... | 99 |
| 5.4.1. Microscopía electrónica de transmisión..... | 100 |
| 5.4.2. Microscopía electrónica de barrido..... | 100 |
| 6. PROGRAMAS INFORMÁTICOS Y BASES DE DATOS..... | 100 |
| 6.1. Edición de plásmidos y diseño de oligonucleótidos..... | 100 |
| 6.2. Análisis de las secuencias de ADN | 100 |
| 6.2.1. Comparación y análisis <i>in silico</i> de secuencias..... | 101 |
| 6.2.2. Análisis filogenético..... | 101 |
| 6.3. Visualización de imágenes | 101 |
| 6.4. Análisis Estadístico | 101 |
| 6.5. Gestor bibliográfico..... | 101 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 103 |
| CAPÍTULO I: ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS Y CELULOSA EN RHIZOBIA | 107 |
| 1. PRODUCCIÓN DE CELULASAS..... | 107 |

| | |
|---|------------|
| 1.1. Detección de actividad celulolítica en cepas de microorganismos que nodulan leguminosas | 107 |
| 1.2. Aislamiento y caracterización molecular del gen <i>celC</i> | 109 |
| 1.2.1. Clonación y secuenciación..... | 110 |
| 1.2.2. Análisis de la secuencia obtenida..... | 111 |
| 1.3. Análisis filogenético del gen <i>celC</i> | 114 |
| 1.3.1. Secuenciación del gen <i>celC</i> en especies del género <i>Rhizobium</i> .. | 116 |
| 1.3.2. Análisis filogenético comparativo con el 16S..... | 120 |
| 1.3.3. Análisis filogenético comparativo con los genes <i>recA</i> y <i>atpD</i> | 121 |
| 1.3.4. Análisis filogenético y comparación con el gen <i>nodC</i> | 123 |
| 2. PRODUCCIÓN DE CELULOSA EN RHIZOBIA..... | 145 |
| 2.1. Estudio de la biosíntesis de celulosa en rhizobia | 145 |
| 2.2. Caracterización molecular del operón <i>celABC</i> de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii ANU843 | 149 |
| 2.2.1. Secuenciación | 149 |
| 2.2.2. Análisis de la expresión | 151 |
| 2.3. Análisis <i>in silico</i> del operón <i>celABC</i> y la región adyacente..... | 153 |
| | |
| CAPÍTULO II: ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN <i>celC</i> (I): PROCESO DE INFECCIÓN PRIMARIA | 159 |
| | |
| 1. Obtención de la cepa mutante <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii ANU843ΔC2..... | 159 |
| 1.1. Determinación del número de copias del gen <i>celC</i> | 159 |
| 1.2. Interrupción del gen <i>celC</i> y clonación en un plásmido suicida... | 161 |
| 1.3. Transformación y selección de intercambio alélico..... | 163 |
| | |
| 2. Complementación de la cepa mutante | 165 |
| | |
| 3. Caracterización de las cepas obtenidas..... | 167 |
| 3.1. Actividad celulolítica | 167 |
| 3.1.1. Ensayo en colonias..... | 168 |
| 3.1.2. Ensayo de difusión en placa..... | 169 |
| 3.1.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida y zimograma..... | 169 |
| 3.1.4. Cuantificación de actividad celulolítica..... | 171 |

| | |
|---|-----|
| 3.2. Fenotipo simbiótico en <i>Trifolium repens</i> | 173 |
| 3.2.1. Ensayos de infectividad..... | 173 |
| 3.2.2. Ensayos de nodulación | 176 |

CAPÍTULO III: ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN *celC* (II): PROCESO DE INFECCIÓN SECUNDARIA 191

| | |
|--|------------|
| 1. Obtención de la cepa recombinante <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii ANU843C2⁺ | 191 |
| 2. Caracterización de las cepas obtenidas | 192 |
| 2.1. Actividad celulolítica..... | 192 |
| 2.1.1. Ensayo en colonias y de difusión en placa..... | 192 |
| 2.1.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida y zimograma | 193 |
| 2.1.3. Cuantificación de actividad celulolítica | 194 |
| 2.2. Fenotipo simbiótico en <i>Trifolium repens</i> | 195 |
| 2.2.1. Ensayos de infectividad..... | 195 |
| 2.2.2. Ensayos de nodulación | 203 |
| 2.2.3. Ensayos de medida del grado de competitividad | 211 |
| 2.2.4. Estudio de la respuesta de la planta..... | 213 |

CAPÍTULO IV: EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA CELULASA *CelC*: EFECTO EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS *S. meliloti-Medicago* Y EN EL INTERCAMBIO MOLECULAR DE SEÑALES 223

| | |
|---|------------|
| 1. Obtención de la cepa recombinante <i>S. meliloti</i> 1021C2⁺ | 223 |
| 2. Caracterización de la cepa obtenida | 225 |
| 2.1. Actividad celulolítica..... | 225 |
| 2.1.1. Ensayos de difusión en placa | 225 |
| 2.1.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida y zimograma | 226 |
| 2.1.3. Cuantificación de la actividad celulolítica | 227 |
| 2.2. Fenotipo en <i>Trifolium repens</i> | 228 |
| 2.3. Fenotipo simbiótico en <i>Medicago sativa</i> | 229 |
| 2.3.1. Ensayos de infectividad..... | 229 |
| 2.3.2. Ensayos de nodulación | 231 |

| | |
|--|------------|
| 3. Efecto de la celulasa CelC2 en la percepción de los factores de nodulación por parte de la planta..... | 238 |
| 3.1. Fenotipo simbiótico de <i>Medicago truncatula</i> inoculada con <i>S. meliloti</i> 1021C2 ⁺ | 238 |
| 3.2. Influencia de la celulasa CelC2 en los pulsos de Ca ²⁺ producidos en los pelos radicales de <i>M. truncatula</i> | 241 |
| 3.3. Evaluación de la expresión de los genes de nodulación temprana de la planta | 244 |

CAPÍTULO V: ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA CELULASA CelC2 EN LA BIOSÍNTESIS DE CELULOSA Y LA FORMACIÓN DE BIOFILMS 251

| | |
|--|------------|
| 1. Implicación de la celulasa CelC2 en la biosíntesis de celulosa.. | 251 |
| 1.1. Caracterización del fenotipo de las cepas ANU843ΔC2 y ANU843C2 ⁺ en relación con la biosíntesis de celulosa..... | 252 |
| 1.1.1. Crecimiento en medio sólido | 252 |
| 1.1.2. Crecimiento en medio líquido..... | 253 |
| 1.1.3. Tinción de celulosa | 257 |
| 2. Implicación de la celulosa en la formación de biopelículas..... | 261 |
| 2.1. Ensayos <i>in vitro</i> | 262 |
| 2.1.1. Ensayo en placas de microtitulación de PVC | 262 |
| 2.1.2. Ensayo de adhesión a superficies de vidrio y PVC..... | 263 |
| 2.1.3. Ensayo de adhesión a arena | 264 |
| 2.2. Ensayos <i>in planta</i> | 266 |
| 2.2.1. Adhesión y colonización de la superficie de la raíz..... | 268 |
| 2.2.2. Adhesión y colonización de los pelos radicales..... | 269 |

DISCUSIÓN GENERAL 271

CONCLUSIONES..... 295

BIBLIOGRAFÍA..... 299

2. ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Evolución de la población mundial y la superficie cultivada | 3 |
| Figura 2. Árbol filogenético basado en el gen 16S de algunas α - β - y γ - Proteobacteria..... | 10 |
| Figura 3. Imagen de una célula bacteriana en vida libre tomada mediante microscopía electrónica de transmisión | 11 |
| Figura 4. Leguminosas importantes para el consumo humano y animal . | 14 |
| Figura 5. Características morfológicas de <i>Trifolium repens</i> | 15 |
| Figura 6. Características morfológicas de <i>M. sativa</i> | 16 |
| Figura 7. Mecanismos de infección de leguminosas..... | 18 |
| Figura 8. Esquema del Intercambio de señales moleculares entre la planta y el microorganismo..... | 20 |
| Figura 9. Microfotografías de microscopía electrónica de barrido que muestran la colonización y adhesión a la raíz por parte de los rizobios | 22 |
| Figura 10. Estructura de la celulosa. | 23 |
| Figura 11. Esquema y microfotografía de la formación y desarrollo del canal de infección..... | 25 |
| Figura 12. Esquema y fotografías de la liberación de las bacterias en el nódulo y diferenciación en bacteroides fijadores de nitrógeno..... | 26 |
| Figura 13. Mecanismos de entrada alternativos en rhizobia. | 28 |
| Figura 14. Estudios de microscopía electrónica que muestran la hidrólisis localizada de la pared celular vegetal en el punto de entrada de la bacteria en la planta..... | 32 |
| Figura 15. Efecto biológico de los enzimas hidrolíticos de <i>Rhizobium</i> <i>leguminosarum</i> bv. trifolii sobre <i>Trifolium repens</i> | 35 |
| Figura 16. Microscopía de luz polarizada del pelo radical | 36 |
| Figura 17. Vector pGEM [®] -T-Easy..... | 53 |
| Figura 18. Vector pK18 <i>mobsacB</i> | 53 |
| Figura 19. Vector pBBR1MCS-2..... | 54 |
| Figura 20. Tamaños esperados de los fragmentos de ADN de los distintos marcadores de peso molecular empleados en este trabajo. | 70 |
| Figura 21. Placas utilizadas para los ensayos relacionados con la formación de biopelículas en distintos sustratos inertes. | 84 |
| Figura 22. Tipos de cultivos de plantas llevados a cabo en este trabajo según las condiciones descritas. | 94 |

| | |
|--|-----|
| Figura 23. Detección de actividad celulolítica mediante el ensayo en doble capa utilizando carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato en cepas tipo de diferentes géneros de microorganismos que nodulan leguminosas..... | 109 |
| Figura 24. Diseño de los oligonucleótidos CelCexF y C2R para la amplificación del gen <i>celC2</i> | 111 |
| Figura 25. Ensayo de detección de actividad celulolítica en placa de las cepas de <i>E. coli</i> | 111 |
| Figura 26. Secuencia nucleotídica del gen <i>celC2</i> | 112 |
| Figura 27. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia del gen <i>celC2</i> | 112 |
| Figura 28. Estructura cristalina de una endoglucanasa de la familia 8 de las glicosil hidrolasas..... | 113 |
| Figura 29. Amplificación por PCR del gen <i>celC</i> mediante los cebadores C1F-C2R en distintas especies de microorganismos que nodulan leguminosas. . | 118 |
| Figura 30. Árbol filogenético del gen <i>celC</i> (800 nt) de cepas tipo y aislados representativos de diferentes biovariedades del género <i>Rhizobium</i> obtenidas y de las especies actualmente descritas de la familia <i>Rhizobiaceae</i> .. . | 127 |
| Figura 31. Árbol filogenético del gen ribosómico 16S (1475 nt) de cepas tipo y aislados representativos de diferentes biovariedades del género <i>Rhizobium</i> obtenidas y de las especies actualmente descritas de la familia <i>Rhizobiaceae</i> .. . | 131 |
| Figura 32. Árbol filogenético del gen <i>recA</i> (520 nt) de cepas tipo y aislados representativos de diferentes biovariedades del género <i>Rhizobium</i> obtenidas y de las especies actualmente descritas de la familia <i>Rhizobiaceae</i> .. . | 135 |
| Figura 33. Árbol filogenético del gen <i>atpD</i> (500 nt) de cepas tipo y aislados representativos de diferentes biovariedades del género <i>Rhizobium</i> obtenidas y de las especies actualmente descritas de la familia <i>Rhizobiaceae</i> .. . | 139 |
| Figura 34. Árbol filogenético del gen <i>nodC</i> (840 nt) de cepas tipo y aislados representativos de diferentes biovariedades del género <i>Rhizobium</i> obtenidas y de las especies actualmente descritas de la familia <i>Rhizobiaceae</i> .. . | 143 |
| Figura 35. Producción de celulosa en distintas cepas tipo representativas de los géneros analizados | 146 |
| Figura 36. Escala cualitativa de producción de celulosa a partir de cuatro cepas tipo representativas que tienen diferente afinidad por el Rojo Congo..... | 148 |
| Figura 37. Amplificación de fragmentos intra- e intergénicos del operón <i>celABC</i> | 152 |
| Figura 38. Mapa genético de la región de operones <i>celABC</i> en distintas bacterias de la familia <i>Rhizobiaceae</i> | 154 |
| Figura 39. Mapa de restricción de la sonda empleada..... | 159 |
| Figura 40. Comprobación del número de copias del gen <i>celC</i> mediante hibridación tipo “Southern Blot”..... | 160 |
| Figura 41. Secuencia de aminoácidos de la proteína CelC2..... | 161 |

| | |
|---|-----|
| Figura 42. Ensayo de detección de actividad celulolítica en placa de las cepas de <i>E. coli</i> DH5 α transformadas con los plásmidos pPM Δ C2, pPMC2 y pL209 Δ C2 respectivamente. | 161 |
| Figura 43. Estrategia para la construcción del plásmido pL209 Δ C2. | 162 |
| Figura 44. Reemplazamiento génico del gen <i>celC</i> y comprobación de la integración homóloga mediante PCR. | 164 |
| Figura 45. Estrategia para la construcción del plásmido pJZC2. | 166 |
| Figura 46. Ensayo de actividad carboximetilcelulásica en colonias de la cepa silvestre <i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii ANU843 y los mutantes ANU843 Δ C2 y ANU843 Δ C2comp. | 168 |
| Figura 47. Detección de actividad celulolítica mediante difusión radial en placa en extractos celulares obtenidos por sonicación de la cepa silvestre <i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii ANU843 y los mutantes ANU843 Δ C2 y ANU843 Δ C2comp. | 169 |
| Figura 48. Zimograma sobre gel de agarosa-CMC para la detección de isoenzimas con actividad celulasa (C1 y C2) en extractos celulares de la cepa silvestre <i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii ANU843 y los mutantes ANU843 Δ C2 y ANU843 Δ C2comp. | 170 |
| Figura 49. Actividad celulolítica en extractos celulares de la cepa silvestre <i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii ANU843, el mutante knock-out del gen <i>celC</i> (ANU843 Δ C2) y de la cepa complementada (ANU843 Δ C2comp). | 172 |
| Figura 50. Sucesión de eventos relacionados con la infección primaria de plantas de trébol blanco inoculadas con la cepa silvestre ANU843 y la cepa mutante ANU843 Δ C2. | 174 |
| Figura 51. Cinética de nodulación de plantas de trébol blanco inoculadas con las cepas ANU843, ANU843 Δ C2 y ANU843 Δ C2comp. | 177 |
| Figura 52. Desarrollo nodular (Nod) y fenotipo final (Fix) de plantas representativas de trébol blanco 40 días después de ser inoculadas con la cepa silvestre ANU843, el mutante defectivo en el gen <i>celC</i> ANU843 Δ C2 y sin inocular. | 178 |
| Figura 53. Microscopía de fluorescencia de distintas etapas del proceso de infección en <i>T. repens</i> por las cepas ANU843GPF y ANU843 Δ C2GPF. | 180 |
| Figura 54. Secciones longitudinales de nódulos aparentemente ocupados que aparecieron en algunas plantas de trébol blanco 40 días después de ser inoculadas con la cepa ANU843 Δ C2. | 181 |
| Figura 55. Longitud de la parte aérea y de la raíz de las plantas de trébol (<i>Trifolium repens</i>) sin inocular e inoculadas con las cepas ANU843, ANU843 Δ C2 y ANU843 Δ C2comp. | 183 |
| Figura 56. Desarrollo nodular (Nod) y fenotipo final (Fix) de plantas de trébol blanco 40 días después de ser inoculadas con la cepa silvestre ANU843 y la cepa complementada en el gen <i>celC</i> ANU843 Δ C2comp. | 184 |
| Figura 57. Eficiencia fijadora de las cepas de estudio determinada mediante la longitud de la parte aérea, de la raíz, peso seco y contenido en | |

| | |
|--|-----|
| nitrógeno medio de las plantas de trébol (<i>Trifolium repens</i>) sin inocular (Control-) e inoculadas con las cepas ANU843 y ANU843ΔC2 en invernadero..... | 185 |
| Figura 58. Fenotipo final (Fix) de plantas de trébol blanco 90 días después de ser inoculadas con la cepa silvestre ANU843 y la cepa con el gen <i>celC</i> interrumpido ANU843ΔC2. | 186 |
| Figura 59. Ensayos de actividad carboximetilcelulásica de las cepa <i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii ANU843, ANU843EV y ANU843C2 ⁺ | 192 |
| Figura 60. Electroforesis en gel de poliacrilamida y zimograma de revelado sobre este gel para la detección de isoenzimas con actividad celulásica en extractos celulares de las cepas de estudio | 193 |
| Figura 61. Actividad celulolítica en extractos celulares de la cepa silvestre <i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii ANU843, ANU843C2 ⁺ y ANU843ΔC2comp. | 194 |
| Figura 62. Sucesión de eventos relacionados con la infección primaria de plantas de trébol blanco inoculadas con las cepas ANU843 y ANU843C2 ⁺ | 196 |
| Figura 63. Microscopía electrónica y óptica de distintos eventos relacionados con la infección primaria en trébol blanco inoculado con la cepa superproductoras ANU843C2 ⁺ y el enzima CelC2 purificado..... | 197 |
| Figura 64. Liberación de las bacterias en el nódulo durante el proceso de infección secundaria. | 199 |
| Figura 65. Formación de simbiosomas en el nódulo durante el proceso de infección secundaria por las cepas ANU843 y ANU843C2 ⁺ | 200 |
| Figura 66. Visualización de la estructura de la celulosa en la epidermis y en las paredes de células vasculares de la raíz mediante microscopía de luz polarizada de raíces y nódulos de <i>Trifolium repens</i> | 202 |
| Figura 67. Desarrollo nodular (Nod) de plantas representativas de trébol blanco 40 días después de ser inoculadas con la cepa silvestre ANU843 y ANU843C2 ⁺ | 204 |
| Figura 68. Parámetros de nodulación de plantas de trébol blanco inoculadas con las cepas ANU843, ANU843C2 ⁺ con distintas cantidades de inóculo | 207 |
| Figura 69. Fenotipo de trébol blanco sin inocular y después de ser inoculadas con las cepas ANU843 y ANU843C2 ⁺ a distintas concentraciones de inóculo | 208 |
| Figura 70. Eficiencia fijadora de las cepas de estudio determinada mediante la longitud de la parte aérea, de la raíz, peso seco y contenido en nitrógeno medio de las plantas de trébol (<i>Trifolium repens</i>) sin inocular (Control-) e inoculadas con las cepas ANU843 y ANU843C2 ⁺ en invernadero..... | 210 |
| Figura 71. Fenotipo final (Fix) de plantas de trébol blanco 90 días después de ser inoculadas con la cepa silvestre ANU843 y la cepa ANU843C2 ⁺ | 211 |
| Figura 72. Comprobación de la obtención de la cepa ANU843GUS..... | 212 |
| Figura 73. Capacidad competitiva de cepas de <i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii..... | 213 |

| | |
|---|-----|
| Figura 74. Perfil de fenoles obtenido tras someter a cromatografía líquida extractos obtenidos a partir de raíces de <i>Trifolium repens</i> sometidas a diversos tratamientos..... | 215 |
| Figura 75. Porcentaje de pelos radicales de <i>Trifolium repens</i> que presentan respuesta ROS tras diferentes periodos de tiempo post-inoculación con las cepas ANU843EV y ANU843C2 ⁺ o sin inocular. | 217 |
| Figura 76. Microscopía confocal mostrando la producción de ROS en <i>Trifolium repens</i> | 219 |
| Figura 77. Estrategia de obtención de la cepa <i>S. meliloti</i> 1021C2 ⁺ | 224 |
| Figura 78. Ensayos de actividad carboximetilcelulásica de las cepas <i>S. meliloti</i> 1021 y 1021C2 ⁺ | 225 |
| Figura 79. Electroforesis en gel de acrilamida y zimograma de revelado sobre este gel para la detección de isoenzimas con actividad celulásica. | 226 |
| Figura 80. Actividad celulolítica en extractos celulares de las cepas silvestres <i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii ANU843/ANU843C2 ⁺ y <i>S. meliloti</i> 1021/1021C2 ⁺ | 227 |
| Figura 81. Sucesión de eventos en plantas de trébol a los 7 días de ser inoculadas con la cepa 1021GFP y 1021GFPC2 ⁺ | 228 |
| Figura 82. Sucesión de eventos relacionados con la infección primaria de plantas de alfalfa inoculadas con las cepas 1021GFP y 1021GFPC2 ⁺ | 230 |
| Figura 83. Desarrollo nodular (Nod) de plantas representativas de alfalfa después de ser inoculadas con la cepa 1021 y 1021C2 ⁺ | 232 |
| Figura 84. Parámetros de nodulación de plantas de alfalfa inoculadas con las cepas 1021, 1021C2 ⁺ con distintas cantidades de inóculo..... | 233 |
| Figura 85. Fenotipo simbiótico de plantas de alfalfa sin inocular y después de ser inoculadas con la cepa 1021 o 1021C2 ⁺ a distintas concentraciones de inóculo..... | 235 |
| Figura 86. Fenotipo final de plantas de alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) representativas inoculadas con las cepas 1021 y 1021C2 ⁺ y sin inocular cultivadas en invernadero..... | 236 |
| Figura 87. Eficiencia fijadora de las cepas de estudio determinada mediante la longitud de la parte aérea, de la raíz, peso seco y contenido en nitrógeno de las plantas de alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) sin inocular (Control-) e inoculadas con las cepas 1021 y 1021C2 ⁺ cultivadas en invernadero..... | 237 |
| Figura 88. Microscopía óptica de los eventos relacionados con la infección primaria en <i>M. truncatula</i> a los tres días de ser inoculada con <i>S. meliloti</i> 1021 y 1021C2 ⁺ | 239 |
| Figura 89. Fenotipo simbiótico de plantas de <i>M. truncatula</i> inoculadas con la cepa <i>S. meliloti</i> 1021 y 1021C2 ⁺ | 240 |
| Figura 90. <i>Spiking</i> de calcio inducido por los Factores de Nodulación y efecto que produce la adición de la celulasa CelC2 en <i>M. truncatula</i> | 242 |

| | |
|---|-----|
| Figura 91. Actividad GUS en las raíces de plantas transformadas con la fusión transcripcional entre el promotor MtENOD11 y el gen GUS a las 6 horas tras el tratamiento con agua (control), 1 pm de Factores Nod (NF) en solitario o junto con 1U del enzima CelC (NF+ CelC). | 245 |
| Figura 92. Actividad GUS en las raíces de plantas transformadas con la fusión transcripcional entre el promotor MtENOD11 y el gen GUS a distintos tiempos tras el tratamiento con agua (control) o con 100 µl de una suspensión de <i>S. meliloti</i> 1021 o <i>S. meliloti</i> 1021C2 ⁺ | 246 |
| Figura 93. Crecimiento en medio sólido de la cepa ANU843 y los mutantes ANU843ΔC2 y ANU843C2 ⁺ | 253 |
| Figura 94. Crecimiento en fase estacionaria en cultivo líquido de las cepas utilizadas en este estudio | 254 |
| Figura 95. Ensayo de floculación de las cepas de estudio. | 255 |
| Figura 96. Curvas de crecimiento de las distintas cepas de estudio en medio YMB. | 256 |
| Figura 97.- Crecimiento en cultivo sólido estático con YMA + Rojo Congo | 258 |
| Figura 98. Tinción con Calcoflúor y posterior visualización mediante microscopía de fluorescencia de las cepas utilizadas en este estudio: | 259 |
| Figura 99. Ensayo en placas de poliestireno de las distintas cepas de estudio. | 263 |
| Figura 100. Formación de biofilms en láminas de PVC tubos de vidrio. | 264 |
| Figura 101. Ensayo de adhesión a arena de las cepas de estudio marcadas con GFP | 265 |
| Figura 102. Ensayos <i>in planta</i> utilizando <i>Trifolium repens</i> como sustrato teñido con yoduro de propidio para estudiar la capacidad de formar biofilms | 266 |
| Figura 103. Unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de raíz que aparecen tras el recuento de las distintas cepas de estudio. | 267 |
| Figura 104. Microscopía electrónica de barrido de la superficie de la raíz de plantas de <i>Trifolium repens</i> inoculadas con la cepa <i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii ANU843wt (A, C) o la cepa superproductora de la celulasa CelC2 ANU843C2 ⁺ | 268 |
| Figura 105. Sucesión de eventos relacionados con la adhesión de las cepas de estudio en pelos radicales de trébol. | 269 |
| Figura 106. Representación esquemática del modo de acción de la celulasa CelC2 durante la etapa de degradación de la punta de un pelo radical tras la formación del cayado de pastor y la progresión del canal de infección. | 282 |
| Figura 107. Ruta biosintética de celulosa vegetal (Peng <i>et al.</i> , 2002) y bacteriana (propuesta en este trabajo) | 289 |

3. ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----|
| Tabla 1. Principales impactos provocados por el abuso de fertilizantes nitrogenados | 4 |
| Tabla 2. Localización en el hospedador de diversos microorganismos diazotrofos que interaccionan específicamente con plantas..... | 6 |
| Tabla 3. Clasificación de las bacterias que nodulan leguminosas pertenecientes a la familia <i>Rhizobiaceae</i> | 8 |
| Tabla 4. Clasificación de las bacterias que nodulan leguminosas no pertenecientes a la familia <i>Rhizobiaceae</i> | 9 |
| Tabla 5. Clasificación de las bacterias que nodulan leguminosas no incluidas como “clásicos rhizobia”..... | 9 |
| Tabla 6. Etapas del proceso de infección rizobio-leguminosa y moléculas sintetizadas por la bacteria imprescindibles para que se lleven a cabo..... | 19 |
| Tabla 7. Cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> utilizadas en este trabajo..... | 45 |
| Tabla 8. Cepas de <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 utilizadas | 46 |
| Tabla 9. Aislados representativos de diferentes biovariedades del género <i>Rhizobium</i> | 46 |
| Tabla 10. Cepas tipo de microorganismos que establecen simbiosis con leguminosas y afines..... | 46 |
| Tabla 11. Plásmidos utilizados en este trabajo..... | 55 |
| Tabla 12. Producción de celulasas en distintas cepas tipo de referencia y representativas de microorganismos que establecen simbiosis con leguminosas y afines. | 108 |
| Tabla 13. Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos en diferentes proteínas CelC homólogas que presentaban una mayor similitud con el fragmento de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> amplificado..... | 110 |
| Tabla 14. Genes que codifican celulasas en rhizobia..... | 116 |
| Tabla 15. Cepas tipo y aislados representativos de diferentes biovariedades del género <i>Rhizobium</i> en los cuales fue amplificado y secuenciado el gen <i>celC</i> en este estudio..... | 117 |
| Tabla 16. Porcentajes de identidad en las secuencias del gen <i>celC</i> en las cepas de estudio | 125 |
| Tabla 17. Porcentajes de identidad en las secuencias del gen ribosómico 16S en las cepas de estudio..... | 129 |
| Tabla 18. Porcentajes de identidad en las secuencias del gen <i>recA</i> en las cepas de estudio..... | 133 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 19. Porcentajes de identidad en las secuencias del gen <i>atpD</i> en las cepas de estudio..... | 137 |
| Tabla 20. Porcentajes de identidad entre secuencias del gen <i>nodC</i> en las cepas de estudio..... | 141 |
| Tabla 21. Producción de celulosa en distintas cepas tipo y de referencia de microorganismos que establecen simbiosis con leguminosas..... | 146 |
| Tabla 22. Porcentaje de homología de CelA, CelB y CelC de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii ANU843 con otras proteínas de microorganismos que establecen simbiosis con plantas..... | 150 |
| Tabla 23. Posibles operones relacionados con la biosíntesis de celulosa localizados en el genoma de los rizobios secuenciados..... | 156 |
| Tabla 24. Fenotipo simbiótico en las primeras etapas del proceso de infección de la cepa silvestre (ANU843) y el mutante knock-out (ANU843ΔC2) inoculados en trébol blanco..... | 175 |
| Tabla 25. Fenotipo simbiótico en las primeras etapas del proceso de infección de las cepas ANU843EV y ANU843C2 ⁺ inoculadas en trébol..... | 198 |
| Tabla 26. Concentración de ácido salicílico libre y total por gramo de peso fresco de raíz en muestras obtenidas a partir de raíces de trébol sin inocular e inoculadas con las cepas ANU843EV y ANU843C2 ⁺ | 216 |
| Tabla 27. Determinación de la capacidad de floculación y la longitud de las microfibrillas de celulosa y de las células de las cepas de estudio..... | 259 |
| Tabla 28. Fenotipo simbiótico de la cepa silvestre <i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii ANU843, el mutante knock-out del gen <i>celC</i> (ANU843ΔC2), la cepa complementada (ANU843ΔC2comp), la cepa recombinante superproductora de la celulasa CelC2 (ANU843C2 ⁺); la cepa silvestre <i>S. meliloti</i> 1021 y la cepa recombinante que expresa de forma heteróloga la celulasa CelC2 (1021C2 ⁺), inoculadas en <i>Trifolium repens</i> | 277 |

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

| | | | |
|---------------|----------------------------------|------------|---------------------------------------|
| °C | Grados centígrados | MM | Medio mínimo |
| ® | Marca registrada | MOPS | Morfolinopropanosulfónico |
| Δ | Delección | NF | Factores de nodulación |
| A | Adenina | ng | Nanogramo |
| Ap | Ampicilina | nm | Nanómetro |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico | nt | Nucleótido |
| APS | Persulfato amónico | ORF | Marco de lectura abierta |
| ARN | Ácido ribonucleico | pb | Pares de bases |
| BSA | Albúmina de suero bovino | PAGE | Polyacrylamide gel electrophoresis |
| BCA | 4,4'-Dicarboxi-2,2'-Biquinolina | PCA | Tampón fosfato- citrato |
| bv. | Biovariedad | PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| C | Citosina | R | <i>Reverse</i> |
| cm | Centímetro | r/s | Resistente/ Sensible |
| CMC | Carboximetilcelulosa | RNasa | Ribonucleasa |
| dNTP | Deoxinucleótido- 5'-trifosfato | r.p.m. | Revoluciones por minuto |
| D.O. | Densidad óptica | s | Segundo |
| DTT | Ditiotreitol | Sac | Sacarosa |
| EDTA | Ácido etilendiaminoetetracético | SDS | Dodecilsulfato Sódico |
| <i>et al.</i> | y colaboradores | sp | Especie |
| F | <i>Forward</i> | SSC | Solución de citrato y cloruro sódicos |
| g | Gramos | T | Timina |
| G | Guanina | T | Cepa tipo |
| GFP | <i>Green Fluorescent Protein</i> | TAE | Tris acético EDTA |
| h | Hora (s) | <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> |
| kb | Kilobase | TEMED | Tetrametilendiamida |
| kDa | Kilodalton | TFB | Tampón de transformación |
| km | Kanamicina | Tris | Tris (hidroximetil) aminometano |
| L. | Linneo | TY | Tryptone Yeast |
| l | Litro | U | Uracilo |
| LB | Luria Bertani | UV | Ultravioleta |
| M | Molar | V | Voltio |
| μg | Microgramo | v | Volumen |
| μl | Microlitro | VRB | Violet Red Agar |
| μm | Micrometro | X-Gal | 5-Bromo-4-cloro-3-indol |
| mbar | Milibares | | β- D- galactósido |
| mg | Miligramo | YMA | Yeast Mnanitol Agar |
| min | Minuto (s) | YMB | Yeast Mannitol Broth |
| ml | Mililitro | W | Wattios |
| mm | Milímetro | wt | Cepa silvestre |

INTRODUCCIÓN



1. LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

1.1. Importancia ecológica y económica

El nitrógeno es un elemento esencial para la vida ya que forma parte de los ácidos nucleicos y las proteínas y por tanto interviene en el metabolismo de cualquier célula (Paerl y Priscu, 1998). Es el gas más abundante en la atmósfera (78%), sin embargo constituye un factor limitante en la producción agrícola debido a que sólo puede ser asimilado por las plantas desde el suelo combinado con O_2 o H_2 en forma de nitratos o amonio. Existe un grupo de organismos procariotas llamados diazotrofos, capaces de transformar el nitrógeno inerte en formas reactivas mediante un proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno, vital para el mantenimiento del ciclo de este elemento en la Tierra.

Hasta el siglo XX, la fijación de nitrógeno era llevada a cabo principalmente de forma natural y en agricultura se aprovechaba mediante algunas prácticas como la rotación de cultivos. Sin embargo, esta fuente de nitrógeno no era suficiente para abastecer las necesidades alimenticias de la creciente población mundial. Ante las dificultades de aumentar el número de hectáreas dedicadas al cultivo, el incremento de la productividad por unidad de superficie se perfilaba como la única solución.

En 1930, los científicos Fritz Haber y Carl Bosch lograron la síntesis industrial de amonio a partir de N_2 , descubrimiento por el que ambos fueron galardonados con el premio Nobel de química. Este hallazgo desencadenó la llamada “revolución verde” de la agricultura gracias a que su aplicación para la producción de fertilizantes nitrogenados supuso un espectacular crecimiento del rendimiento de los cultivos y contribuyó al aumento demográfico que tuvo lugar a mediados del siglo pasado (Galloway, 2005) (Figura 1).

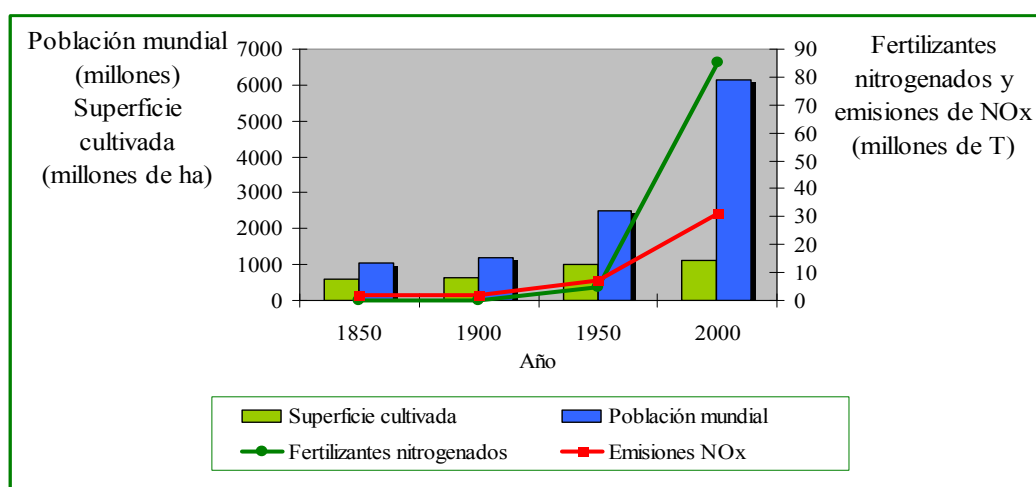


Figura 1. Evolución de la población mundial y la superficie cultivada así como de la cantidad de fertilizantes nitrogenados empleados y la emisión de NOx en los últimos 150 años (Adaptado de Galloway *et al.* 2005).

Sin embargo, el aporte de fertilizantes en agricultura ha introducido grandes cambios en el ciclo del nitrógeno debido a las ineficiencias que su uso conlleva. Se estima que la mitad del N_2 fijado industrialmente se pierde por procesos de lixiviación y desnitrificación en el agua y la atmósfera (Vitousek *et al.*, 1997). Según las estimaciones de la UNESCO en 2007, el uso de los fertilizantes, junto con los combustibles fósiles, ha provocado un aumento del 50% del aporte de nitrógeno combinado al medio ambiente respecto al que se produce por procesos naturales, generando graves problemas ambientales y sociales (UNESCO, 2007).

Las pérdidas de N_2 por desnitrificación liberan a la atmósfera especies reactivas de nitrógeno, conocidas conjuntamente como NO_x (Figura 1). Dentro de ellos, el más peligroso es el óxido nitroso (N_2O), cuya contribución al calentamiento global por tonelada se estima en unas 296 veces la del dióxido de carbono (CO_2), aunque su efecto global es menor, siendo además uno de los agentes implicados en la destrucción de la capa de ozono. Estos compuestos alteran el balance global de algunos gases de la atmósfera denominados de “efecto invernadero” como el CO_2 , el metano (CH_4) y el ozono troposférico (O_3), causante además de graves daños directos a la vegetación y agente precursor del “smog” fotoquímico, problema de gran alcance en atmósferas urbanas.

La contaminación atmosférica provocada por los óxidos de nitrógeno provoca graves consecuencias en la salud humana ya que se relaciona con mayores tasas de enfermedades cardiopulmonares. También se estima que los ajustes ecológicos derivados del exceso de nitrógeno pueden provocar el aumento de la producción de polen, generando mayor número de reacciones alérgicas, y la incidencia de algunas enfermedades infecciosas (Cowling *et al.*, 2001).

Las pérdidas provocadas por la lixiviación de los compuestos derivados del nitrógeno en el suelo provocan acidificación y aparición de fenómenos de eutrofización en los ecosistemas terrestres y acuáticos, afectando a la biodiversidad que habita en ellos. La contaminación de los acuíferos con nitritos y nitratos puede contribuir a la aparición de enfermedades como el cáncer y la metahemoglobinemia, que se produce principalmente en niños (Bohloul *et al.*, 1992). Todos estos impactos se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales impactos provocados por el abuso de fertilizantes nitrogenados (Adaptado de Cowling *et al.* 1998).

| EFFECTOS SOBRE EL MEDIO AMBIENTE | EFFECTOS SOBRE LA SALUD HUMANA |
|---|---|
| Efecto invernadero | Problemas cardiopulmonares |
| Disminución de la capa de ozono | Enfermedades por contaminación del agua |
| “Smog” fotoquímico y lluvia ácida | Aumento de las alergias |
| Acidificación y eutrofización | Incremento enfermedades infecciosas |

Por otro lado, la síntesis de fertilizantes nitrogenados conlleva un elevado consumo energético ya que el proceso de Haber-Bosch requiere condiciones de alta presión y temperatura para llevarse a cabo. Esto origina un progresivo encarecimiento de estos productos y un agravamiento de la actual crisis energética. Además, la aplicación de fertilizantes al suelo inhibe la fijación biológica, impidiendo el aprovechamiento de esta fuente de nitrógeno.

Actualmente, el ser humano sigue transformando el ciclo global del nitrógeno a un ritmo desmesurado, que viene reflejado en un aumento del consumo de combustibles fósiles, la creciente demanda de nitrógeno, y las ineficiencias en su uso generalizado. Al mismo tiempo, la producción de alimentos en algunas partes del mundo es deficiente en nitrógeno, poniendo en relieve las desigualdades en la distribución de fertilizantes. La optimización de la necesidad de este recurso humano clave y la reducción al mínimo de sus consecuencias negativas requiere un enfoque interdisciplinario integrado y el desarrollo de estrategias para disminuir los residuos que contienen nitrógeno (Galloway *et al.*, 2008).

Para la UNESCO, el principal reto es intentar optimizar los aportes de nitrógeno para permitir la vida en la tierra, minimizando los impactos negativos en el medio ambiente y en la salud humana que la utilización de abonos químicos conlleva. Las directrices que debe tomar la política a nivel mundial se recogen en la declaración de Nanjing de 2004 sobre la gestión del nitrógeno, donde se insiste en la necesidad de incrementar la eficiencia en su uso para evitar las pérdidas antes enumeradas debido a que se prevé un aumento inminente de las necesidades de producción agrícola no sólo para uso alimentario, sino también para el desarrollo de biocombustibles. De lo contrario, esta fuente de energía alternativa viable incrementará más aún los impactos negativos en el ciclo del N₂ ya que supondrá un mayor aporte al suelo de fertilizantes nitrogenados (Erisman, 2004).

Actualmente, más del 50% del nitrógeno atmosférico fijado anualmente procede de la fijación biológica llevada a cabo por microorganismos diazotrofos (Galloway, 2005). Este proceso, que el hombre llevaba aprovechando miles de años mediante la rotación de cultivos, está siendo objeto de intensas investigaciones científicas ya que su aprovechamiento en agricultura permite reducir el uso de fertilizantes químicos. Sin embargo, la eficiencia de este proceso es relativamente baja, especialmente en el caso de los fijadores en vida libre ya que aportan al suelo menos de 1 Kg/ha al año, cantidad insuficiente para satisfacer las necesidades de los cultivos. En función de las especies vegetales y de los rizobios presentes en el suelo, esta cantidad puede llegar a los 300 Kg/ha al año, suficientes para determinados cultivos de leguminosas (Urzúa, 2005). Esta cantidad también puede aumentar considerablemente en el caso de la fijación simbiótica, teniendo en cuenta la eficiencia del proceso, las leguminosas cultivadas fijan un promedio del 66% de la fijación biológica de nitrógeno total, estimado entre 23 y 176 Kg/ha anuales (Herridge *et al.*, 2008).

Para poder disminuir la dependencia de los fertilizantes nitrogenados que está adquiriendo la agricultura mundial se han propuesto varias alternativas que abarcan desde la modificación genética de las plantas a la optimización y mejora de la fijación biológica de nitrógeno. Su potenciación en agricultura, no sólo aminoraría el gasto que representa la fertilización nitrogenada, sino que también obviaría los mencionados peligros que su abuso lleva consigo (Vance, 2001).

1.2. Microorganismos fijadores de nitrógeno

La capacidad de fijar nitrógeno está restringida a los organismos procariotas, incluyendo tanto a las arqueas como a las eubacterias pertenecientes a los phyla *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Spirochaetes* y *Proteobacteria*, siendo este último el que engloba más cantidad de diazotrofos (revisado en Kneip *et al.*, 2007). Los microorganismos fijadores de nitrógeno constituyen un grupo heterogéneo ya que, la única característica que comparten es la presencia de un complejo enzimático denominado nitrogenasa, encargado de llevar a cabo la reducción de nitrógeno molecular a amonio. Esta reacción requiere un alto consumo de energía y ausencia de oxígeno molecular, por ello, los microorganismos diazotrofos han desarrollado distintas estrategias para crear ambientes anaerobios. Entre estos mecanismos se encuentran altas tasas respiratorias en *Azotobacter*, diferenciación de células especializadas, como los heterocistos de algunas cianobacterias filamentosas, y la biosíntesis de proteínas con alta afinidad por el oxígeno, como la leghemoglobina, presente en los nódulos fijadores de nitrógeno que se generan en la simbiosis entre rizobios y leguminosas.

Las características fisiológicas y morfológicas de estas simbiosis varían ampliamente en función del tipo de microorganismos y las plantas que participan en ellas. Los microorganismos son capaces de llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno en vida libre y algunos de ellos establecen relaciones simbióticas con otros organismos, generalmente eucariotas, para proporcionarles nitrógeno combinado. En la mayoría de cianobacterias y algunas proteobacterias como *Azospirillum*, la simbiosis se establece de forma extracelular, sin embargo en otras asociaciones las bacterias se localizan dentro de la planta a nivel inter o intracelular, como en el caso de *Gluconacetobacter* capaz de penetrar en la caña de azúcar o *Azoarcus*, endófito de *Oryza sativa* (Tabla 2).

Tabla 2. Localización en el hospedador de diversos microorganismos diazotrofos que interactúan específicamente con plantas.

| LOCALIZACIÓN EN EL HOSPEDADOR | | PHYLUM | BACTERIA | HOSPEDADOR | REFERENCIA |
|-------------------------------|--------------------------------|----------------|-------------------------|--|----------------------------------|
| Extracelular/ Intercelular | | Cyanobacteria | <i>Nostoc</i> sp. | Briofitos (Antoceros) | (Endelin y Meeks, 1983) |
| | | | <i>Anabaena</i> sp. | Pteridófitos (<i>Azolla</i>) | (Peters y Meeks, 1989) |
| | | | <i>Cyanothece</i> sp. | Gimnospermas (Cycadaceae) | (Honegger, 1991) |
| | Proteobacteria | | <i>Azospirillum</i> sp. | Gramíneas (<i>Zea mays</i> , <i>Oryza sativa</i>) | (Bashan <i>et al.</i> , 2004) |
| | | | <i>Klebsiella</i> | | (Iñiguez <i>et al.</i> , 2004) |
| Intracelular | Sin estructuras especializadas | Proteobacteria | <i>Azoarcus</i> sp. | | (Hurek <i>et al.</i> , 2002) |
| | | Cyanobacteria | <i>Nostoc</i> sp. | Angiospermas (<i>Gunnera</i>) | (Rasmussen <i>et al.</i> , 1994) |
| | Nodular | Actinobacteria | <i>Frankia</i> sp. | Actinorrizas | (Benson y Silvester, 1993) |
| | | Proteobacteria | Rizobios | Leguminosas | (Brewin, 1991) |

Existen otras simbiosis endofíticas en las que incluso la planta crea una estructura especializada para albergar a la bacteria donde llevará a cabo la fijación de nitrógeno, el nódulo, como en las asociaciones entre *Frankia* y plantas actinorrícicas y entre los rizobios y las leguminosas (Kneip *et al.*, 2007) (Tabla 2). En algunos casos, como la asociación entre rizobios y leguminosas, esta simbiosis es estricta ya que la bacteria sólo puede fijar nitrógeno si se encuentra en el interior de la planta.

Las asociaciones simbióticas en las que participan cianobacterias y otras bacterias que fijan nitrógeno en vida libre presentan cierto interés en los cultivos de arroz y en algunas gramíneas. Sin embargo, las simbiosis más eficientes son las que implican una relación específica y estricta entre el microorganismo y la planta, como la que se produce en el interior de los nódulos. La asociación de *Frankia*, un actinomiceto fijador de nitrógeno, con plantas leñosas pertenecientes a diferentes familias, denominadas actinorrizas, tiene gran interés desde el punto de vista forestal y ecológico. Sin embargo, la simbiosis mutualista entre los rizobios y las leguminosas representa la mayor fuente renovable de nitrógeno y es la mejor estudiada por su importancia agronómica, económica y social.

2. LOS RIZOBIOS

Los rizobios (del griego rizo=raíz y bios=vida) son bacterias capaces de llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno en el interior de nódulos de plantas leguminosas, pero no necesitan a su hospedador para sobrevivir ya que también pueden crecer como saprobios en el suelo e incluso en el interior de plantas leguminosas y no leguminosas como endófitos.

2.1. Taxonomía de los rizobios

Los rizobios constituyen un grupo muy amplio de bacterias que están distribuidos por todo el mundo y que engloba familias diferentes con características fenotípicas y moleculares muy distintas. En la actualidad, la descripción de nuevos géneros y especies de rhizobia se basa en características fenotípicas, genotípicas y simbióticas (Stackebrandt *et al.*, 2002). Algunos autores consideran rhizobia a todas las bacterias con capacidad de nodular (Lindstrom *et al.*, 2010). Sin embargo, para otros se debe distinguir entre los verdaderos rhizobia, pertenecientes a las α -Proteobacteria incluidos en las tablas 3 y 4 y otras bacterias no-rhizobia con capacidad de nodular recogidas en la tabla 5. Algunos géneros incluyen otros microorganismos cuyo hospedador se desconoce o bien no se han localizado sus genes *nod*, como *R. daejonense*, aislado de un biorreactor (Quan *et al.*, 2005) o *B. betae*, aislado de remolacha (Rivas *et al.*, 2004).

Tabla 3. Clasificación de las bacterias que nodulan leguminosas pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae*, orden *Hyphomicrobiales*, de las alfa-Proteobacteria conocidas como “clásicos rhizobia”. Adaptado de Lindstrom *et al.*, 2010.

| FAMILIA | GÉNERO | ESPECIE | HOSPEDADOR |
|-------------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| <i>Rhizobiaceae</i> | <i>Rhizobium</i> | <i>R. alkalisoli</i> | <i>Caragana</i> |
| | | <i>R. etli</i> | <i>Phaseolus...</i> |
| | | <i>R. cellulosityticum</i> | <i>Medicago sativa</i> |
| | | <i>R. fabae</i> | <i>Viciae, Pisum</i> |
| | | <i>R. galegae</i> | <i>Galega</i> |
| | | <i>R. gallicum</i> | <i>Phaseolus</i> |
| | | <i>R. giardinii</i> | <i>Phaseolus</i> |
| | | <i>R. hainanense</i> | <i>Desmodium...</i> |
| | | <i>R. herbae</i> | <i>Leguminosas chinas</i> |
| | | <i>R. huautlense</i> | <i>Sesbania</i> |
| | | <i>R. indigoferae</i> | <i>Indigofera</i> |
| | | <i>R. leguminosarum</i> | <i>Pisum, Trifolium...</i> |
| | | <i>R. loessense</i> | <i>Astragalus...</i> |
| | | <i>R. lusitanum</i> | <i>Phaseolus vulgaris</i> |
| | | <i>R. mesosinicum</i> | <i>Albizia, Kummerowia...</i> |
| | | <i>R. miluonense</i> | <i>Lespedeza spp.</i> |
| | | <i>R. mongolense</i> | <i>Medicago</i> |
| | | <i>R. multihospiticum</i> | <i>Robinia, Halimodendron...</i> |
| | | <i>R. oryzae</i> | <i>Phaseolus, Glycine</i> |
| | | <i>R. phaseoli</i> | <i>Phaseolus, Trifolium.</i> |
| | | <i>R. pisi</i> | <i>Pisum...</i> |
| | | <i>R. rhizogenes</i> | <i>Phaseolus</i> |
| | | <i>R. sullae</i> | <i>Hedysarum</i> |
| | | <i>R. tibeticum</i> | <i>Trigonella</i> |
| | | <i>R. tropici</i> | <i>Phaseolus ...</i> |
| | | <i>R. tubonense</i> | <i>Oxytropis</i> |
| | | <i>R. undicola</i> | <i>Neptunia natans</i> |
| | <i>R. vignae</i> | <i>Leguminosas chinas</i> | |
| | <i>R. yanglingense</i> | <i>Amphicarpaea ...</i> | |
| | <i>Sinorhizobium (Ensifer)</i> | <i>S. arboris</i> | <i>Acacia</i> |
| | | <i>S. chiapanecum</i> | <i>Acacia</i> |
| | | <i>S. fredii</i> | <i>Glycine max</i> |
| | | <i>S. kostiense</i> | <i>Acacia</i> |
| <i>S. kummerowiae</i> | | <i>Kummerowia</i> | |
| <i>S. meliloti</i> | | <i>Medicago...</i> | |
| <i>S. medicae</i> | | <i>Medicago</i> | |
| <i>S. saheli</i> | | <i>Acacia</i> | |
| <i>S. terangae</i> | | <i>Acacia</i> | |
| <i>S. xinjiangensis</i> | | <i>Glycine max</i> | |
| <i>Shinella</i> | <i>S. kummerowiae</i> | <i>Kummerowia</i> | |

Tabla 4. Clasificación de las bacterias que nodulan leguminosas del orden *Hyphomicrobiales* (alfa-Proteobacteria) conocidas como “clásicos rhizobia” no pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae*. Adaptado de Lindstrom *et al.*, 2010.

| FAMILIA | GÉNERO | ESPECIE | HOSPEDADOR |
|---------------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| <i>Phyllobacteriaceae</i> | <i>Mesorhizobium</i> | <i>M. albiziae</i> | <i>Albizia kalkora</i> |
| | | <i>M. alhagi</i> | <i>Alhagi</i> |
| | | <i>M. amorphae</i> | <i>Amorpha</i> |
| | | <i>M. australianum</i> | <i>Biserrula</i> |
| | | <i>M. caraganae</i> | <i>Caragana</i> |
| | | <i>M. camelthorni</i> | <i>Alhagi, Medicago...</i> |
| | | <i>M. chacoense</i> | <i>Prosopis</i> |
| | | <i>M. ciceri</i> | <i>Cicer</i> |
| | | <i>M. gobiense</i> | <i>Glycyrrhiza, Lotus...</i> |
| | | <i>M. huakuii</i> | <i>Astragalus</i> |
| | | <i>M. loti</i> | <i>Lotus</i> |
| | | <i>M. mediterraneum</i> | <i>Cicer</i> |
| | | <i>M. metallidurans</i> | <i>Anthyllis</i> |
| | | <i>M. opportunistum</i> | <i>Biserrula</i> |
| | | <i>M. plurifarium</i> | <i>Acacia ...</i> |
| | | <i>M. septentrionale</i> | <i>Astragalus</i> |
| | | <i>M. shangrilense</i> | <i>Caragana</i> |
| <i>M. tarimense</i> | <i>Glycyrrhiza, Lotus...</i> | | |
| <i>M. temperatum</i> | <i>Astragalus</i> | | |
| <i>M. tianshanense</i> | <i>Sophora, Glycyrrhiza.</i> | | |
| <i>Nitrobacteraceae</i> | <i>Bradyrhizobium</i> | <i>B. canariense</i> | <i>Genistea</i> |
| | | <i>B. elkanii</i> | <i>Glycine...</i> |
| | | <i>B. iriomotense</i> | <i>Macroptilium</i> |
| | | <i>B. japonicum</i> | <i>Glycine...</i> |
| | | <i>B. jicamae</i> | <i>Pachyrhizus</i> |
| | | <i>B. liaoningense</i> | <i>Glycine</i> |
| | | <i>B. pachyrhizi</i> | <i>Pachyrhizus</i> |
| <i>B. yuanmingense</i> | <i>Lespedeza...</i> | | |
| <i>Hyphomicrobiaceae</i> | <i>Azorhizobium</i> | <i>A. caulinodans</i> | <i>Sesbania</i> |
| | | <i>A. dobereineriae</i> | <i>Sesbania</i> |

Tabla 5. Clasificación de las bacterias que nodulan leguminosas pertenecientes a las alfa- y beta- Proteobacteria no incluidas como “clásicos rhizobia”. Adaptado de Lindstrom *et al.*, 2010.

| FAMILIA | GÉNERO | ESPECIE | HOSPEDADOR |
|-----------------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Clase I. α -Proteobacteria | | | |
| <i>Hyphomicrobiaceae</i> | <i>Devosia</i> | <i>D. neptuniae</i> | <i>Neptunia natans</i> |
| <i>Methylobacteriaceae</i> | <i>Methylobacterium</i> | <i>M. nodulans</i> | <i>Crotalaria</i> |
| <i>Phyllobacteriaceae</i> | <i>Phyllobacterium</i> | <i>P. trifolii</i> | <i>Trifolium</i> |
| | <i>Blastobacter</i> | <i>B. denitrificans</i> | <i>Aeschynomene</i> |
| <i>Brucellaceae</i> | <i>Ochrobactrum</i> | <i>O. cytisi</i> | <i>Cytisus</i> |
| | | <i>O. lupini</i> | <i>Lupinus albus</i> |
| Clase II. β -Proteobacteria | | | |
| <i>Burkholderiaceae</i> | <i>Burkholderia</i> | <i>B. cepacia</i> complex | <i>Dalbergia</i> |
| | | <i>B. mimosarum</i> | <i>Mimosa</i> |
| | | <i>B. nodosa</i> | <i>Mimosa</i> |
| | | <i>B. phymatum</i> | <i>Machaerium lunatum</i> |
| | | <i>B. sabiae</i> | <i>Mimosa</i> |
| | | <i>B. tuberum</i> | <i>Aspalathus carnosa</i> |
| | <i>Cupriavidus</i> | <i>C. taiwanensis</i> | <i>Mimosa</i> |

Recientemente se ha descubierto que existen otras especies de rizobios pertenecientes a la división β -Proteobacteria (Tabla 5 y figura 2). En algunos casos estas bacterias poseen genes simbióticos relacionados con los de otras especies de rizobios, por lo que probablemente han sido adquiridos por transferencia horizontal en la rizosfera ya que la mayoría se encuentran en plásmidos o islas simbióticas (Moulin *et al.*, 2001). Algunos géneros se encuentran taxonómicamente muy distantes entre sí (Figura 2).

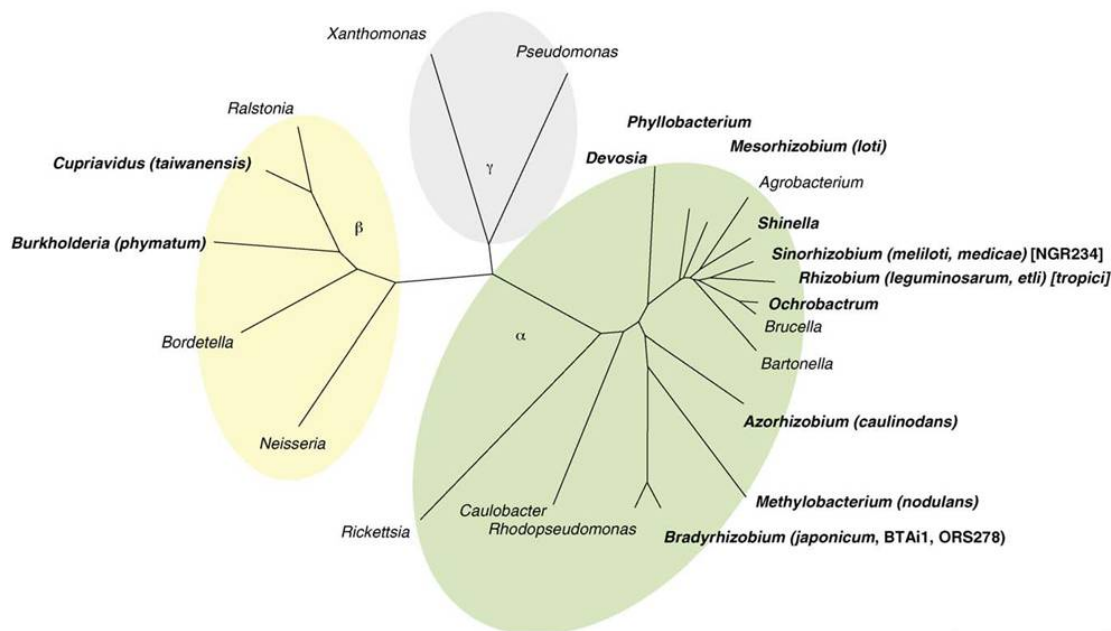


Figura 2. Árbol filogenético basado en el gen 16S de algunas α - β - y γ -Proteobacteria. Los géneros en negrita contienen especies de rizobios, distinguiendo aquellos cuyo genoma está secuenciado (entre paréntesis) o en proceso (entre corchetes). (Masson-Boivin *et al.*, 2009).

2.2. Familia *Rhizobiaceae*

Esta familia incluye un conjunto fenotípicamente heterogéneo de bacterias aerobias, de forma bacilar y Gram negativas, formado por varios géneros entre los cuales solamente se ha demostrado que incluyen especies con capacidad de nodular *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Shinella* (Tabla 3). Una de las características distintivas que comparten los microorganismos pertenecientes a estos géneros es que son de crecimiento rápido, a diferencia de las especies de otros géneros de rizobia como *Mesorhizobium* que presentan un crecimiento moderado y las cepas de *Bradyrhizobium*, que crecen lentamente.

2.2.1. El género *Rhizobium*

Los microorganismos incluidos en el género *Rhizobium* son bacilos Gram-negativos cuyo tamaño oscila entre 0,5 a 0,9 μm de ancho por 1,2 a 3,0 μm de largo (Figura 3 A). Son heterótrofos y tienen la capacidad de producir ácido a partir de muchos azúcares. Generalmente se mueven cuando son jóvenes por medio de flagelos peritricos, polares o subpolares. No forman endosporas, pero contienen gránulos de poli- β -hidroxibutirato. La mayoría de las cepas producen abundantes polisacáridos extracelulares mucilaginosos, de composición variable según la cepa y el medio de cultivo. En medio de cultivo YMA forman colonias de 1 a 5 mm de diámetro después de 3 a 5 días de incubación (Jordan, 1984) (Figura 3 B).

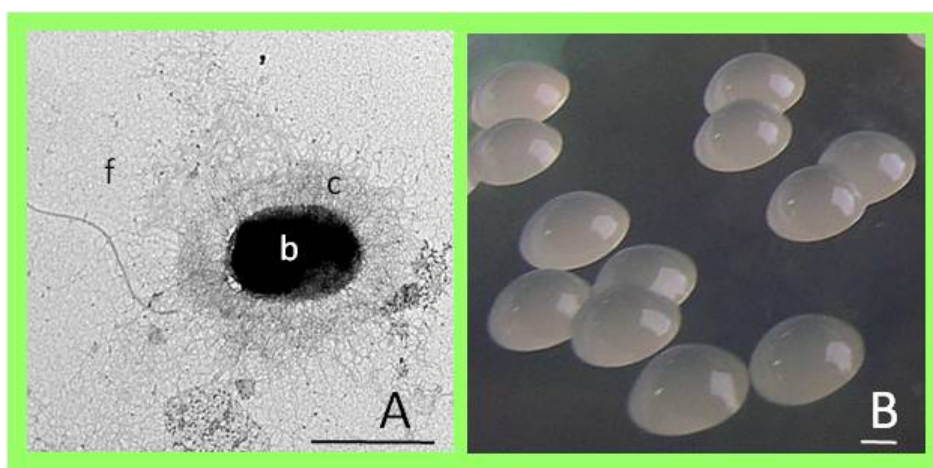


Figura 3. Imagen de una célula bacteriana en vida libre tomada mediante microscopía electrónica de transmisión (b, bacteria; c, cápsula; f, flagelo) (A) y de colonias aisladas (B), ambas pertenecientes a la especie *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Escalas 1 μm (A) y 1 mm (B).

Los rizobios englobados dentro de este género nodulan *Phaseolus* y otras leguminosas de climas templados como *Trifolium*, *Vicia*, *Lens*, y *Pisum*. Los genes que determinan la especificidad de la simbiosis se encuentran en plásmidos que pueden ser transferidos entre distintas especies en la rizosfera, así, distintas especies pueden establecer simbiosis con una misma leguminosa y viceversa.

En 1888 Beijerinck fue el primero en aislar un cultivo bacteriano puro de un nódulo de leguminosa, al que denominó *Bacillus radicicola*. En 1889, Frank propuso el nombre *Rhizobium* para estos aislados. Las siguientes cepas que fueron obtenidas a partir de otras leguminosas fueron clasificándose según el hospedador específico del que se aislaban, de forma que en 1929 ya se habían reconocido seis especies: *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. japonicum* y *R. lupini* (Wang *et al.*, 2001). La designación de las especies de *Rhizobium* en base a su “grupo de inoculación cruzada” se intentó sustituir por una clasificación que incluyera otros criterios taxonómicos. Así, algunas de las antiguas especies de *Rhizobium* fueron incluidas dentro de nuevos géneros (Sawada *et al.*, 2003).

Actualmente la taxonomía de los rizobios se desarrolla rápidamente y durante los últimos 20 años se han descrito muchas especies y géneros nuevos (Tabla 3).

Esta nueva clasificación en base a criterios fenotípicos, genotípicos y simbióticos ha propiciado que la taxonomía de las bacterias que nodulan leguminosas se encuentre en transición. Así, por ejemplo, se ha propuesto la reclasificación del género *Agrobacterium*, al que pertenecen microorganismos que inducen tumores y raíces adventicias en plantas, dentro del género *Rhizobium* ya que se encuentran estrechamente relacionados (Velázquez *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2001), aunque no siempre se esté de acuerdo con estas reclasificaciones (Farrand *et al.*, 2003).

Actualmente el género *Rhizobium* consta de 26 especies noduladoras de las cuales *R. leguminosarum* es la especie tipo del género. Hasta el año 1984 *R. trifolii* y *R. phaseoli* estaban consideradas como especies distintas, pero ese año el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática se propuso su reclasificación como biovariedades dentro de la especie *R. leguminosarum* creándose además la biovariedad *viciae* (Jordan, 1984). Esta reclasificación fue aceptada por los rizobiólogos aunque no validada oficialmente ya que se basa en la capacidad aparentemente única para nodular una leguminosa en especial de cada biovariedad, por lo que no abandona totalmente el concepto de inoculación cruzada, cuya validez se ha cuestionado reiteradamente.

La segunda edición del Manual Bergey solo describe la especie *R. leguminosarum* y recomienda su revisión taxonómica (Kuykendall, 2005). Recientemente, se ha llevado a cabo esta revisión y se ha comprobado que *R. phaseoli* es una especie actualmente válida, y que *R. trifolii* es un sinónimo de *R. leguminosarum*. Además, se ha comprobado que actualmente existen en diferentes colecciones de cultivo internacionales dos cepas tipo de *R. leguminosarum* que pertenecen a especies diferentes por lo que una de ellas se ha reclasificado en la nueva especie *R. pisi* (Ramírez-Bahena *et al.*, 2008).

2.2.2. El género *Sinorhizobium* (*Ensifer*)

Los microorganismos incluidos en el género *Sinorhizobium* son bacilos Gram negativos cuyo tamaño oscila entre 0,5 a 1,0 μm de ancho por 1,2-3,0 μm de largo. Son aerobios, generalmente presentan gránulos de Poli- β -hidroxiburato y no forman esporas. Son móviles gracias a la presencia de un flagelo polar o subpolar o de uno a seis flagelos peritricos. Forman colonias circulares, convexas, semitranslúcidas y mucilaginosas, normalmente con un diámetro de 2 a 4 mm después de 3 a 5 días de cultivo en medio YMA (Jordan, 1984). Las bacterias pertenecientes a este género nodulan *Medicago* y otras leguminosas de climas interés alimentario como *Glycine* y *Phaseolus*.

El nombre genérico *Sinorhizobium* fue propuesto por Chen en 1988 para incluir a la especie *Rhizobium fredii* en un nuevo género. Más tarde se incluyó en él la especie *S. meliloti* y se describió otra nueva especie capa de nodular alfalfa, que se denominó *S. medicae*. Recientemente se han descrito más especies capaces de nodular *Glycine* y *Lotus*, entre otras. Actualmente, el género *Sinorhizobium* consta de 12 especies de las cuales *S. fredii* es la especie tipo (Tabla 3).

Estudios filogenéticos recientes muestran que las especies del género *Sinorhizobium* están muy relacionadas con *Ensifer adhaerens* (Casida, 1982), por lo que el género *Sinorhizobium* ha sido reclasificado en el género *Ensifer* (Young, 2003), debido a que las reglas de la nomenclatura establecen que un género descrito con anterioridad tiene prioridad sobre los posteriores nombres del mismo. No obstante, la controversia aún persiste debido a que aunque el Comité Judicial de Taxonomía ha resuelto que *E. adhaerens* no puede pasar a llamarse *S. adhaerens* como habían propuesto algunos autores (Willems *et al.*, 2003), el subcomité de taxonomía de rizobia ha propuesto que sigan utilizándose ambos nombres. Por ello, en este trabajo hemos preferido seguir utilizando el nombre de *Sinorhizobium* por ser el más conocido y aceptado entre los rizobiólogos.

3. LAS LEGUMINOSAS

La familia *Leguminosae* o *Fabaceae* (del latín *legumen*, semillas con vainas), constituye un gran grupo dentro de las angiospermas con una enorme biodiversidad morfológica (Figura 4) y una amplísima distribución corológica. Esta familia incluye árboles, arbustos y herbáceas que se pueden encontrar en los más variados hábitats, desde el ártico a los trópicos (Lewis *et al.*, 2005).

Según la clasificación actual se distribuyen en tres subfamilias: *Faboideae*, *Mimosoideae* y *Caesalpinioideae*. Dentro de las dos primeras se han descrito la mayoría de las especies que establecen simbiosis fijadoras de nitrógeno en simbiosis con los rizobios. Sin embargo, dentro de la subfamilia *Caesalpinioideae* la nodulación ha sido menos estudiada porque hasta hace poco tiempo se pensaba que era una característica inusual dentro de este grupo (Sprent, 2007).

La capacidad de fijar nitrógeno en simbiosis es una característica que les confiere bastantes ventajas desde el punto de vista de la colonización de suelos pobres, de la mejora o regeneración de los degradados, y de su utilización en prácticas agrícolas, como la rotación de cultivos, la entresiembrá o el abonado verde, sin olvidar su papel en alimentación humana y animal gracias a su alto contenido en proteínas. La leguminosa con mayor capacidad para fijar nitrógeno es la soja (*Glycine max*) que representa el 77% del nitrógeno fijado por las leguminosas cultivadas (Herridge *et al.*, 2008).

Desde el punto de vista ecológico las leguminosas son de gran importancia ya que la posibilidad de disponer del nitrógeno atmosférico les confiere cierta autonomía respecto a la fertilidad natural del suelo. Por ello, constituyen las primeras colonizadoras en la sucesión ecológica tras la degradación del suelo por alteraciones como incendios, desertización o agotamiento por cultivos extensivos (Crews, 1999). Dentro de ellas hay importantes plantas forrajeras que se usan en recuperación de suelos como la alfalfa (*Medicago sativa*), el trébol (*Trifolium pratense*, *T. repens*...) y algunas especies de altramuces (*Lupinus* sp.). Su uso en rotación de cultivos y como abono verde proporciona gran cantidad de nitrógeno al suelo y puede sustituir a los fertilizantes químicos en los sistemas agrícolas (Biederbeck *et al.*, 1991).

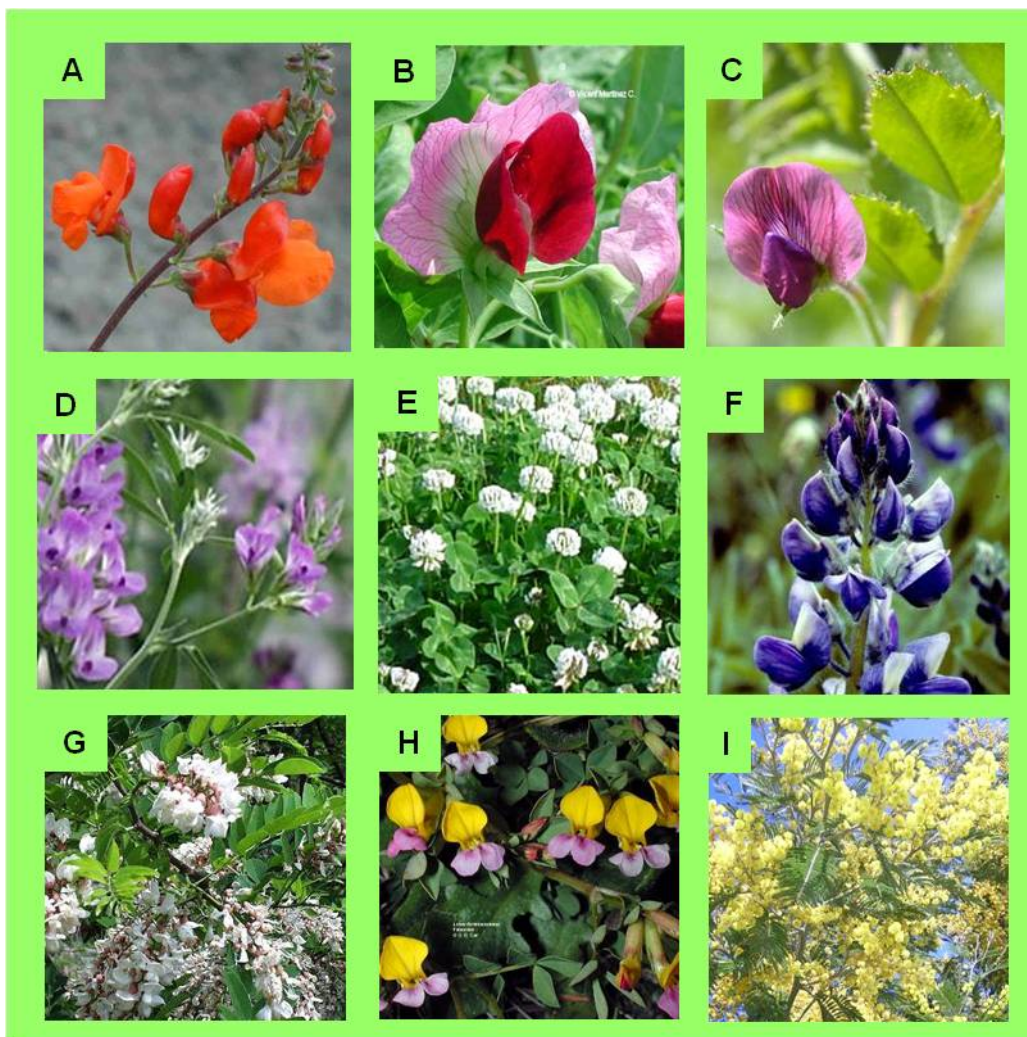


Figura 4. Leguminosas importantes para el consumo humano y animal: A) *Phaseolus coccineus* L. (judía verde); B) *Pisum sativum* L. (guisante) y C) *Cicer arietinum* L. (garbanzo). Leguminosas forrajeras que se usan en recuperación de suelos: D) *Medicago sativa* L. (alfalfa), E) *Trifolium repens* L. (trébol) y F) *Lupinus albus* L. (altramuz). Leguminosas ornamentales: G) *Robinia pseudoacacia* L. (falsa acacia); H) *Lotus formosissimus* (flor de loto) e I) *Acacia dealbata* L. (mimosa).

Desde el punto de vista de la alimentación humana y animal ocupan el segundo lugar en importancia después de los cereales, ya que constituyen una importante fuente proteica tanto frescas como secas, en grano o como pasto (Allen y Allen, 1981). Las leguminosas más extendidas en los pastizales son las pertenecientes a los géneros *Trifolium* y *Medicago*. Dentro de las leguminosas que se consumen en España destacan la alubia (*Phaseolus vulgaris* y *P. coccineus*), el guisante (*Pisum sativum*), el garbanzo (*Cicer arietinum*) y la lenteja (*Lens culinaris*). Además, algunas leguminosas se cultivan para producir madera, por sus aplicaciones medicinales y como plantas ornamentales en parques y jardines, como la falsa acacia (*Robinia pseudoacacia*) y la mimosa (*Acacia dealbata*) (Doyle y Luckow, 2003).

Desgraciadamente, la eficiente capacidad fijadora de nitrógeno en simbiosis con rizobios está prácticamente restringida a esta familia de plantas, aunque también se han descrito asociaciones con no-leguminosas como *Parasponia andersonii* de la familia Ulmaceae (Trinick, 1979).

Los cultivos mayoritarios propios de las tres grandes civilizaciones (trigo, arroz y maíz) siguen requiriendo para conseguir niveles aceptables de productividad en las cosechas la aplicación de grandes cantidades de nitrógeno combinado en forma de fertilizantes o la alternancia con cultivos de leguminosas.

3.1. El Género *Trifolium*

En los países de clima templado la leguminosa más abundante en pastizales es el trébol, cuyo nombre genérico es *Trifolium*, palabra derivada del latín *tres* y *folium*, que significa “tres hojas”. Este género es uno de los más abundantes de la subfamilia *Papilionoideae* e incluye plantas herbáceas anuales, bienales o perennes caracterizadas por sus hojas trifoliadas, usualmente dentadas (Figura 5 A). Las flores se disponen en cabezuelas o espigas de colores púrpura, rojo, o blanco y raramente amarillo (Allen y Allen, 1981) (Figura 4 E).

El trébol siempre ha sido una planta apreciada, ya sea por su importancia en la agricultura como por sus matices culturales. Las especies de *Trifolium* son importantes en todo el mundo por sus usos como plantas forrajeras, para la mejora del suelo y como abono verde. Además, en algunas culturas esta planta ha tenido un significado mágico que se remonta a los antiguos celtas, es un emblema no oficial de Irlanda y actualmente se considera un símbolo universal de buena suerte cuando tiene cuatro hojas.

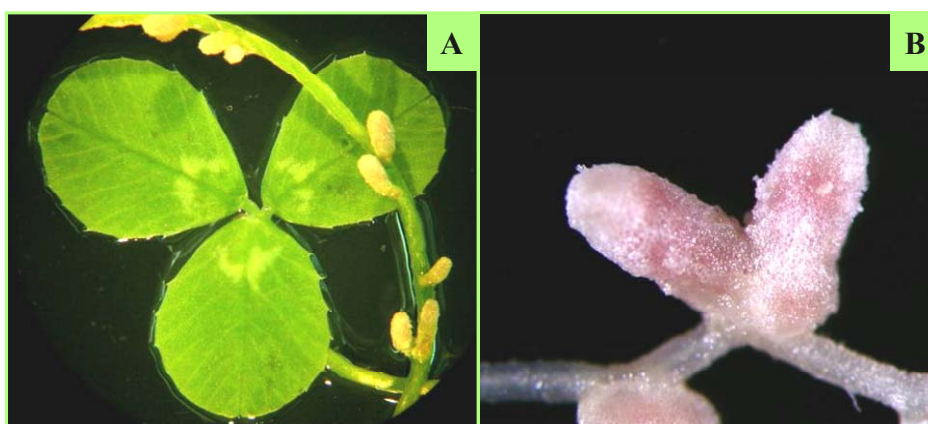


Figura 5. Características morfológicas de *Trifolium repens*. A) Imagen de los tres foliolos y de una raíz nodulada. B) Detalle de un nódulo producido por *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*.

El trébol blanco (*Trifolium repens* L.) es una leguminosa perenne originaria de Europa que se ha convertido en una de las leguminosas más ampliamente distribuidas en el mundo. Sus hojas son de color verde brillante y las flores son blancas o rosas. Se considera como la leguminosa forrajera más importante y el mejor alimento para toda clase de ganado y otros animales de vida salvaje (Allen y Allen, 1981). Su supervivencia en el ecosistema depende en gran medida de la presencia de los rizobios compatibles en el suelo que lleven a cabo a la fijación de nitrógeno en los nódulos que se forman en la raíz (Figura 5 B). Cuando se requiere hacer implantaciones de trébol en zonas donde no existía se pueden sembrar las semillas junto con un inóculo de cepas adecuadas con la finalidad de obtener mayor producción y sobre todo permitir a la planta la colonización de nuevos nichos (Ceballos *et al.*, 1980).

3.2. El Género *Medicago*

Este género está constituido por plantas herbáceas, anuales o perennes, y pequeñas matas. Todas poseen hojas trifolioladas, con estípulas adnatas al pecíolo y folíolos denticulados, con los nervios laterales que llegan hasta el borde del limbo. Las flores poseen la corola azulada o amarilla, y se disponen solitarias, en parejas o agrupadas en racimos, en las axilas foliares (Figura 6A). Fruto más o menos enrollado en espiral (en ocasiones sólo media espira), generalmente indehiscente. Espiras del fruto generalmente con espinas o tubérculos.

Son importantes como plantas forrajeras por su contenido proteico y comparten las características típicas de las leguminosas. Se ha observado nodulación en el 52% de las especies de este género. Las plantas del género *Medicago* forman nódulos indeterminados con rizobios de crecimiento rápido como *S. meliloti*, *S. medicae* y también con *R. mongolense*, con distintos niveles de especificidad y efectividad (van Berkum *et al.*, 1998) (Figura 6Figura 5 B).

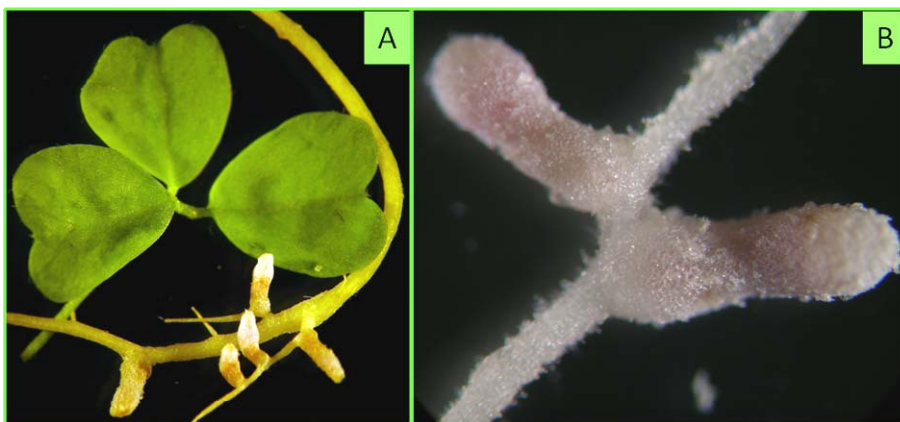


Figura 6. Características morfológicas de *M. sativa*. A) Imagen de los tres folíolos y de una raíz nodulada. B) Detalle de un nódulo producido por *Sinorhizobium meliloti*.

La especie *Medicago sativa*, conocida comúnmente como alfalfa, se cultiva como forrajera, sobre todo en regadío. Tiene un ciclo vital de entre cinco y doce años, y llega a alcanzar una altura de 1 metro, desarrollando densas agrupaciones de pequeñas flores púrpuras. Sus raíces suelen ser muy profundas, lo que la hace resistente a la sequía (Sprent, 2001). La alfalfa procede de Irán, donde probablemente fue adoptada para el uso por parte de los humanos para alimentar al ganado equino (Muller *et al.*, 2003). Actualmente, también se comercializa para el consumo humano como brotes para ensaladas. Esta planta forma nódulos conteniendo bacterias de la especie *S. meliloti* y *S. medicae*, entre otros rizobia.

M. truncatula es una pequeña leguminosa (10-60 cm) nativa de la región mediterránea. Las hojas se caracterizan por presentar un punto negro en el centro. Las flores son amarillas y el fruto es una pequeña vaina espinosa (Sprent, 2001). Esta especie ha sido elegida como organismo modelo ya que posee un pequeño genoma diploide (en proceso de secuenciación), crece relativamente rápido y su producción de semillas es prolífica (Mathesius *et al.*, 2009). Además, es susceptible de ser transformada genéticamente con relativa facilidad. Establece simbiosis con la bacteria *S. meliloti* pero de forma más efectiva con *S. medicae*.

4. PROCESO DE INFECCIÓN *Rhizobium*-LEGUMINOSA

Para llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno, los rizobios no disponen de mecanismos propios que les permitan crear un ambiente anaerobio o microaerófilo (a diferencia de otras proteobacterias, las cianobacterias y las bacterias pertenecientes al género *Frankia*), sino que requieren diferenciarse en bacteroides rodeados de una membrana específica en el interior de nódulos de las raíces de leguminosas.

Un nódulo radical es una estructura única y altamente organizada que se desarrolla como resultado de una compleja secuencia de interacciones a nivel molecular entre los rizobios y las leguminosas. La relación entre ambos se puede calificar como rizoendosimbiosis mutualista estricta, ya que, aunque tanto la planta como la bacteria pueden vivir de forma independiente, su capacidad de interactuar implica algún tipo de beneficio para cada parte involucrada y existe con frecuencia una marcada especificidad entre ambos.

Para que la bacteria fijadora de nitrógeno sea capaz de llegar hasta el nódulo, tanto el macro como el microsimbionte han desarrollado un complejo mecanismo de intercambio de señales moleculares que les permiten reconocerse específicamente entre ellos, desencadenando el denominado proceso de infección. La mayoría de los estudios realizados para dilucidar el mecanismo de infección de las leguminosas por las bacterias rizosféricas se han realizado con plantas del género *Trifolium* y *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*.

Los rizobios pueden penetrar en sus hospedadores utilizando diferentes mecanismos de invasión: a través de unas estructuras tubulares denominadas canales de infección que se forman a través de los pelos radicales, a través de “cracks” o grietas que se forman por heridas de la planta o en las zonas de emergencia de las raíces laterales y nódulos o por la colonización de los espacios

intercelulares (Figura 7) (Capoen *et al.*, 2010; Madsen *et al.*, 2010). La ruta de entrada es específica de cada leguminosa, puesto que algunas bacterias determinadas pueden utilizar rutas de entrada distintas en diferentes plantas (Capoen *et al.*, 2010).



Figura 7. Mecanismos de infección de leguminosas descritos en rizobia (Adaptado de Madsen *et. al* 2010).

4.1. Proceso de infección “canónico” por pelos radicales

El proceso de infección que se establece en la mayoría de las leguminosas comienza con la penetración de los rizobios a través de los pelos radicales, vía de entrada a la que nos referiremos a partir de ahora si no se especifica lo contrario. Una vez en el interior de la planta, las bacterias progresan a través de canales de infección intracelulares que las conducen hasta el nódulo donde comenzarán a llevar a cabo su función fijadora de nitrógeno.

El establecimiento de una simbiosis rizobio-leguminosa eficiente sigue una serie secuencial de etapas (Tabla 6). En cada paso intervienen determinados factores sintetizados por la planta o por el microorganismo. Estas etapas se pueden separar en tres grupos en función de las llamadas propiedades simbióticas:

- Especificidad: capacidad de interactuar a nivel molecular específicamente de forma que el rizobio se adhiere a la raíz e induce en ella la diferenciación del primordio nodular y la deformación completa del pelo radical.
- Infectividad: capacidad de penetrar en el tejido radical de la planta hospedadora y llegar hasta los nódulos a través del canal de infección.
- Efectividad: capacidad de transformarse en bacteroides y reducir el nitrógeno atmosférico a amonio en el interior del nódulo.

Tabla 6. Etapas del proceso de infección rizobio-leguminosa y moléculas sintetizadas por la bacteria imprescindibles para que se lleve a cabo cada una de ellas.

| PROPIEDAD SIMBIÓTICA | ETAPA | FENOTIPO | MOLÉCULAS IMPLICADAS | GENOTIPO | REFERENCIA |
|----------------------|---|----------|-------------------------------|---------------------------------|--|
| Especificidad | Señalización | Had/Noi | Factores de nodulación (NF) | <i>nodABC</i> , <i>nodFE</i> | (Geurts y Bisseling, 2002) |
| | Adhesión al pelo radical | Roc | Ricadhesinas (Rap) | <i>rapA1</i> | (Smit <i>et al.</i> , 1987) |
| | | Roa | Microfibrillas de celulosa | <i>celABC</i> | (Ausmees <i>et al.</i> , 1999; Mateos <i>et al.</i> , 1995) |
| Infectividad | Curvatura y degradación del pelo radical | Hac/Hot | Celulasa C2 | <i>¿celC?</i> | (Mateos <i>et al.</i> , 2001) |
| | Formación y desarrollo del canal de infección | Inf | NF | <i>nodF</i> , <i>nodL</i> | (Ardourel <i>et al.</i> , 1994) |
| | | | Succinoglicano/EPSI | <i>exoY</i> , <i>exoH</i> | (Cheng y Walker, 1998) |
| Efectividad | Liberación en el nódulo | Bar | Proteínas hemo, FixL... | <i>hemA...</i> | (Gilles-González <i>et al.</i> , 1991; Kereszt <i>et al.</i> , 1995) |
| | Fijación de N ₂ | Fix | Reguladores transcripcionales | <i>fixJ</i> , <i>fixK</i> | (Fischer, 1994) |
| | | | Nitrogenasa | <i>nifHDK</i> | (Fischer, 1994) |

4.1.1. Intercambio de señales moleculares

Las raíces de las plantas exudan diversos compuestos a la rizosfera que favorecen el crecimiento de gran cantidad de microorganismos. Uno de estos exudados, los flavonoides, derivados de la 2-fenil-1,4-benzopirona, son sintetizados por las leguminosas como moléculas señal para iniciar el diálogo con los rizobios circundantes que son capaces de nodularlas (Figura 8 A) (Perret *et al.*, 2000).

La composición de los flavonoides varía dependiendo de la leguminosa que los produce, desencadenando una serie de respuestas específicas en los rizobios. Entre estas respuestas destacan la quimiotaxis activa hacia la superficie radical (Gulash *et al.*, 1984) y la inducción de la transcripción de los genes responsables de la nodulación a través de un regulador transcripcional de la familia LysR, conocido como NodD, que activa los genes *nod*, que a su vez codifican todo un paquete de enzimas encargados de la producción de los factores de nodulación (NF) (Figura 8) (Gibson *et al.*, 2008). Los NF están compuestos por un esqueleto de N-acetil-β-D-glucosamina unido por enlaces β-1,4 sintetizados por *nodA*, *nodB* y *nodC*. Los productos de otros genes de nodulación, como *nodFE*, se encargan de añadir una serie de modificaciones a esta estructura que le confieren especificidad al proceso ya que varían incluso dependiendo de la cepa de *Rhizobium* que los sintetiza (Spaink, 2002).

Los NF son capaces de desencadenar a su vez una serie de respuestas específicas en la planta hospedadora encaminadas a albergar al microsimbionte en su interior, incluso a concentraciones muy bajas (10^{-11} – 10^{-12} M) (Shaw y Long, 2003). La elevada sensibilidad de la planta a los NF viene determinada por un mecanismo mediado por receptores que actúan a través de una cascada de señalización. Recientemente se han descrito varios receptores de los factores de nodulación (NFP) (Figura 8) de naturaleza quinasa, con un dominio extracelular y pertenecientes a la familia LysM necesarios para la respuesta de la planta a los NF (Jones *et al.*, 2007).

La presencia de los NF, en primer lugar, induce cambios notables en la fisiología de los pelos radicales susceptibles de ser deformados, como la despolarización de la membrana y la producción de pulsos de calcio en el ápice y en las proximidades del núcleo (Ehrhardt *et al.*, 1996). Aunque aún no se conoce exactamente cuáles son los mecanismos de inducción de los pulsos de Ca^{2+} , varios estudios previos sugieren que los NF probablemente provoquen estos flujos mediante la apertura transitoria de los canales de Ca^{2+} que provocaría un rápido incremento en la concentración de este catión en el citoplasma, seguido de una fase de bombeo de Ca^{2+} de nuevo hacia las zonas que actúan como reservorios de este ión en la planta. La señalización mediada por los pulsos de Ca^{2+} se relaciona con la inducción de los genes tempranos de la nodulación a través de una quinasa (CCaMK o DMI3), que parece ser la encargada de integrar o decodificar los cambios secuenciales en los niveles de Ca^{2+} (Levy *et al.*, 2004), cuya desregulación desemboca en una nodulación espontánea independiente de la presencia de rizobios (Mitra *et al.*, 2004b).

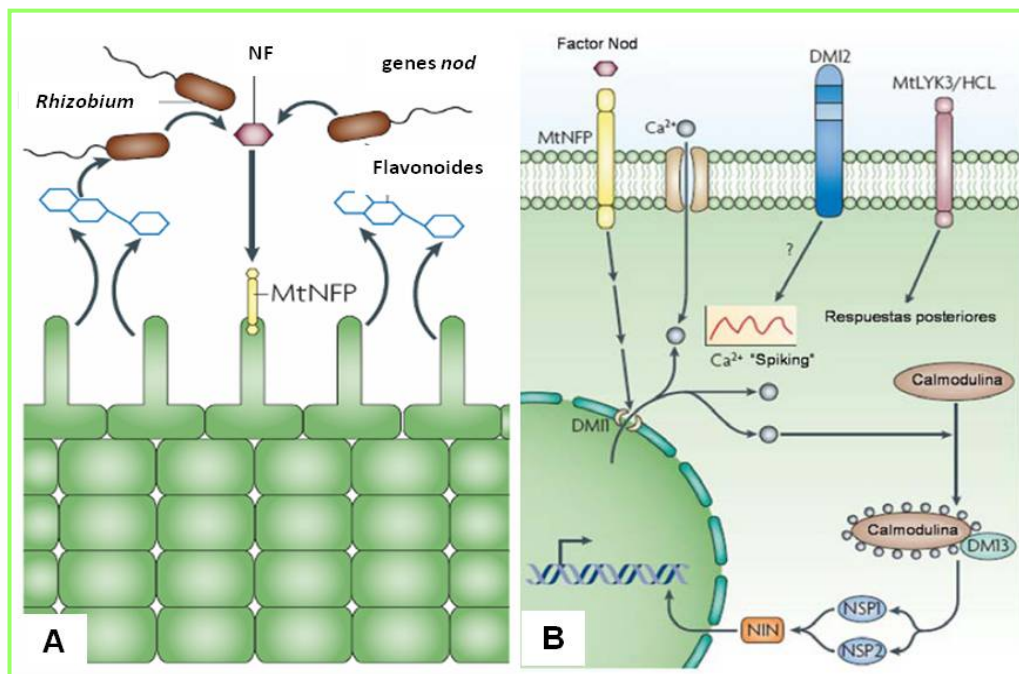


Figura 8. Esquema del Intercambio de señales moleculares entre la planta y el microorganismo. A) Inducción de los genes por parte de los rizobios tras la percepción de los flavonoides. B) Cascada transduccional derivada de la percepción de los factores de nodulación por parte de MtNFP. Esquema adaptado de Jones *et al* 2007. DMI2, MtLYK3/HCL y NIN son moléculas involucradas en el proceso pero de las que aún no se ha demostrado su función concreta. La función del resto de los receptores se explica en el texto.

Esta calmodulina a su vez activa la fosforilación de factores transcripcionales de la familia GRAS (NSP1 y NSP2) (Figura 8) que a su vez inducen la expresión de varios genes denominados conjuntamente nodulinas tempranas (ENODS: “early **n**odulin-genes”) requeridos para la deformación de los pelos radicales y la formación del primordio nodular (Hirsch *et al.*, 2009). Así, estas nodulinas provocan la reorganización del citoesqueleto de actinas originando alteraciones en los pelos radicales conocidas como “Hair deformation” (fenotipo Had) que preceden a la formación del “Hair curling” (fenotipo Hac, Tabla 6) (Oldroyd y Downie, 2008). Los cambios morfológicos observados en los pelos radicales no se producen de forma homogénea en toda la raíz, sino que existen diferencias a lo largo de ésta que permiten distinguir tres zonas. Los pelos radicales más susceptibles de sufrir estas deformaciones son los que se encuentran creciendo activamente en las zonas I y II (1 y 2 cm por encima del meristemo respectivamente), sin embargo, los pelos que ya no se encuentran en crecimiento, localizados en la denominada zona III de la raíz, no son susceptibles de ser deformados (Dazzo *et al.*, 1996; Gage, 2004).

Simultáneamente, los NF inducen la expresión por parte de la planta de otros genes específicos del proceso simbiótico encargados de sintetizar las nodulinas que provocan un incremento de la actividad mitótica en las células del córtex interior, originando el primordio del nódulo (fenotipo Noi: **n**odule initiation) (Geurts y Bisseling, 2002; Lerouge *et al.*, 1990). La adición de NF purificados a las raíces de las plantas inducen el comienzo de la deformación de los pelos radicales y de la formación del nódulo, pero no son suficientes para provocar la formación del “curling” completo y la diferenciación del canal de infección o de nódulos totalmente diferenciados en ausencia de la bacteria (Dazzo *et al.*, 1996; Gage, 2004; Limpens *et al.*, 2003).

4.1.2. Adhesión de la bacteria a los pelos radicales

Los rizobios que se encuentran en las proximidades de la raíz son capaces de detectar la presencia de los flavonoides y otros compuestos exudados por las leguminosas que actúan como atrayentes quimiotácticos de la bacteria iniciando el proceso de colonización de la raíz (fenotipo Roc: **r**oot colonization, Tabla 6) (Miller *et al.*, 2007). Una característica de los rizobios es su capacidad de formar agregados y biofilms para adherirse tanto a la raíz de las plantas como a las partículas de la rizosfera y así evitar ser desplazados de sus nichos ecológicos. La adhesión y posterior colonización de la raíz en rizobios se produce mediante proteínas secretadas al exterior y polisacáridos de superficie.

Varias proteínas han sido propuestas para participar en este proceso, como las ricadhesinas, lectinas y flagelos (Ausmees *et al.*, 2001; De Hoff *et al.*, 2009; Fujishige *et al.*, 2006a). Las ricadhesinas (rhizobial calcium-binding surface protein) median la unión polar de células individuales (Smit *et al.*, 1989). Esta proteína actúa uniéndose al calcio y a uno de los polos de la bacteria y éstos a su vez a los pelos radicales de la planta (Gage, 2004). Por otro lado, los responsables moleculares de la unión de las bacterias al extremo apical de los pelos radicales son las lectinas que se encargan de unir simultáneamente la pared celular de la planta y algunos polisacáridos localizados en la membrana externa de los rizobios (Dazzo y Hrabak, 1981) (Figura 9 A, B).

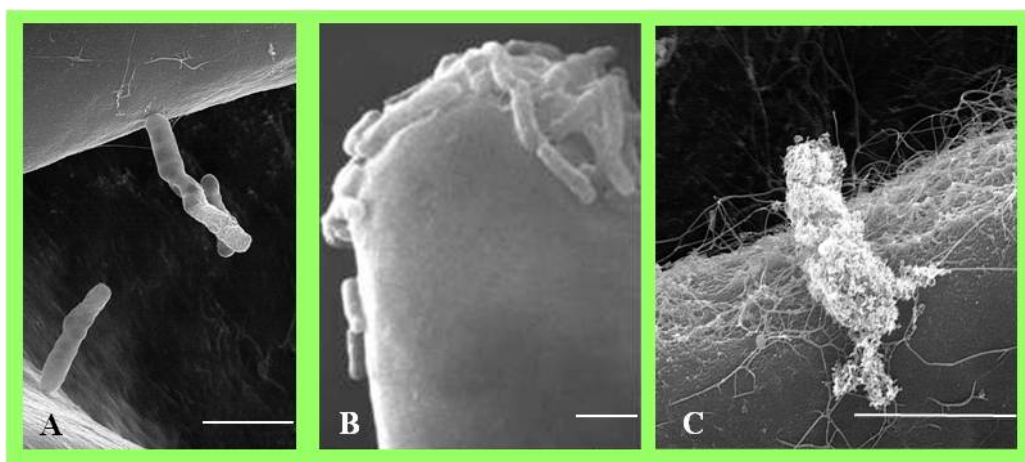


Figura 9. Microfotografías de microscopía electrónica de barrido que muestran la colonización y adhesión a la raíz por parte de los rizobios: **A)** Detalle de la adhesión polar de las bacterias a la planta. **B)** Adhesión específica a la punta del pelo radical mediada por lectinas. **C)** Colonización de la raíz mediante microfibrillas de celulosa producidas por la bacteria. Escala 2 μm .

Así, los rizobios se adhieren a los pelos radicales de su leguminosa hospedadora, un paso preliminar muy importante porque a través de ellos tendrá lugar la infección de la planta (fenotipo Roa: **r**oot **a**dhesion). Los polisacáridos son los componentes principales que participan en estas etapas. Los rizobios producen polisacáridos de naturaleza diversa: capsulares (CPS), exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPS) y 1,2- β -glucanos que se acumulan en la superficie de la bacteria (Davey y O'Toole, 2000). La importancia de los polisacáridos bacterianos en la adhesión a la punta de los pelos radicales y el posterior desarrollo del proceso infeccioso parece crítica, pues, además de su implicación en la competitividad de las cepas, se ha demostrado que mutantes defectivos en la síntesis de los mismos se caracterizan por presentar poca infectividad, baja capacidad para nodular y, en algunos casos, alteraciones en el rango de hospedador (Dazzo *et al.*, 1991; Geremia *et al.*, 1987; Gray y Rolfe, 1990; Hirsch, 1999; Laus *et al.*, 2006; Leigh *et al.*, 1985; Leigh y Lee, 1988; Williams *et al.*, 2008).

Por último, parece ser que las microfibrillas de celulosa están implicadas en la formación de agregados o “caps” tras la adhesión inicial en los pelos radicales (Figura 9 C) (Dazzo *et al.*, 1984; Mateos *et al.*, 1995; Smit *et al.*, 1992). Además, la implicación de la celulosa en procesos de adhesión y colonización a distintos sustratos se ha descrito en otras especies bacterianas, en las que además constituye el compuesto mayoritario de la matriz de los biofilms (Lasa, 2006).

Probablemente la síntesis de celulosa es uno de los procesos bioquímicos más importantes que peor se conocen a nivel molecular debido a su complejidad y alta regulación. La celulosa es un biopolímero lineal de unidades de β -(1,4)-D-glucopiranososa (Figura 10) y es un componente esencial de la pared celular de las plantas, que forma una red con otros polímeros de carbohidratos. Considerada una característica típica de las plantas, también se ha descrito su biosíntesis en bacterias como *Gluconacetobacter xylinum* (Wong *et al.*, 1990) (bacteria modelo

para el estudio de la biosíntesis de celulosa), *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Rhizobium leguminosarum*, entre otras eubacterias (Ross *et al.*, 1991). La celulosa de plantas y bacterias tiene la misma estructura química, pero diferentes propiedades fisicoquímicas (Ross *et al.*, 1991).

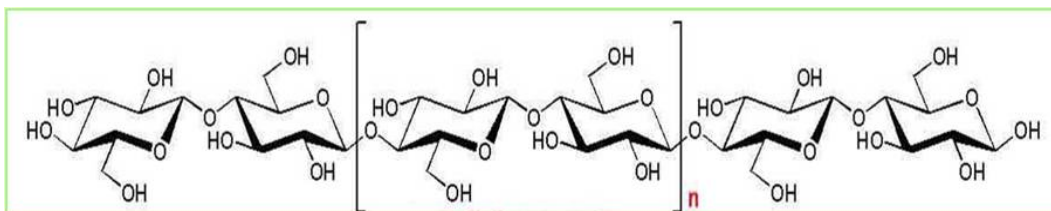


Figura 10. Estructura de la celulosa. Entre corchetes, un dímero de celobiosa.

La biosíntesis de celulosa está determinada por el operón *celABC* en *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Cepas defectivas en producción de celulosa por mutación del *celA* o *celB* son capaces de establecer simbiosis efectivas con las raíces de su hospedador en condiciones de laboratorio, por lo que no parece ser un polisacárido esencial para la infección de la planta (Ausmees *et al.*, 1999; Laus *et al.*, 2005b; Williams *et al.*, 2008) (Tabla 6). Las microfibrillas tienen un diámetro de 1-2 nm y desaparecen tras el tratamiento con celulasa (Mateos *et al.*, 1995). Según ensayos de microscopía realizados por estos autores, la síntesis de celulosa en *R. leguminosarum* bv. *trifolii* se lleva a cabo especialmente al final de la fase exponencial de crecimiento y principio de la fase estacionaria y se induce en contacto con las raíces de la planta (Ausmees *et al.*, 1999).

4.1.3. Curvatura y degradación de la punta pelo radical (Infección primaria).

La primera respuesta microscópicamente visible de la leguminosa, tras el contacto con *Rhizobium*, es la deformación y posterior curvatura del pelo radical (fenotipo Hac: **hair curling**). La entrada de iones Ca^{2+} en el pelo radical como respuesta a los NF, además de servir como mensajero para la inducción de genes y activación de proteínas implicadas en la nodulación, induce una reorganización del citoesqueleto de la célula (Esseling *et al.*, 2003). Estos cambios fisiológicos estimulan el crecimiento diferencial del extremo apical del pelo radical contribuyendo a la progresión de la deformación o “curling” hasta que la curvatura llega a una forma característica conocida como el cayado de pastor (“Shepherd’s crook”) (Shaw *et al.*, 2000).

La deformación completa del pelo radical y el posterior desarrollo del canal de infección requieren la presencia de NF con determinadas sustituciones en las cadenas. Así, mutantes dobles *nodF-nodL* de *Sinorhizobium meliloti* son capaces de inducir deformaciones en los pelos radicales y de estimular la división de las células corticales de la raíz de alfalfa, su hospedador habitual, pero apenas provocan la formación del cayado de pastor y generan canales de infección

aberrantes que abortan antes de llegar a la base del pelo radical (Ardourel *et al.*, 1994) (Tabla 6).

Una vez formado el cayado de pastor, se genera una pequeña cavidad donde los rizobios adheridos a la punta del pelo radical quedan atrapados. Una etapa clave de este proceso es la penetración de la bacteria en el interior del pelo radical de forma que se mantenga la integridad de la célula vegetal y no se aborte el proceso infectivo, por lo que esta etapa puede considerarse crítica para el progreso posterior de la relación simbiótica. Este proceso también es conocido como infección primaria y será abordado más ampliamente en la sección 5 de la introducción.

4.1.4. Formación y desarrollo del canal de infección

Paralelamente, y coincidiendo con la entrada de la bacteria en el pelo radical, en el interior del mismo se produce un trasiego de vesículas que volcarán su contenido en el entorno de la bacteria formando así los primordios del canal de infección (Brewin, 1991). Según se ha sugerido después de diversos estudios microscópicos, se producen una serie de cambios en la disposición de los microtúbulos, y el núcleo celular del pelo radical migra hacia el sitio de infección para comenzar la síntesis de nuevo material (Timmers *et al.*, 1999).

La nueva pared celular continúa su desarrollo alrededor de las bacterias y en dirección a las células corticales de la raíz, originando de esta forma una estructura tubular, denominada canal de infección (fenotipo Inf: **in**fection thread formation); a través de la cual las bacterias van a discurrir por la planta hasta llegar al nódulo. Los rizobios no llegan a interactuar directamente con el interior celular de la planta, sino que existe una separación física debido a que el canal de infección se forma como una continuación de la pared celular del pelo radical. La estructura de la pared celular del canal de infección es similar a la del pelo radical y está compuesta principalmente por pectinas, glucanos y celulosa (Brewin *et al.*, 1994).

Por otro lado, los análisis microscópicos de bacterias marcadas con proteínas fluorescentes *in planta*, una de las técnicas más utilizadas y que ha tenido mayor éxito a la hora de estudiar esta estructura, muestran que la pared celular del canal y las bacterias crecen al unísono y que, únicamente aquellos microorganismos que se encuentran en el extremo del canal de infección que prolifera, se dividen activamente (Gage, 2002) (Figura 11).

A medida que el canal de infección se va formando, es necesaria la degradación de las paredes vegetales para permitir el paso de las bacterias de una célula a otra. El mecanismo de esta hidrólisis aún no ha sido totalmente esclarecido, se ha propuesto que es causado por enzimas pectinolíticas y celulolíticas secretados por la planta hospedadora (Vance, 1983), la bacteria (Mateos *et al.*, 1992; Mateos *et al.*, 2001) o ambos simbioses (van Spronsen *et al.*, 1994). El canal de infección crece hacia dentro como un tubo apoplástico, impulsado por la división bacteriana y por la disposición de la matriz de la pared celular mediada por glicoproteínas ricas en prolina y extensinas (Den Herder y Parniske, 2009).

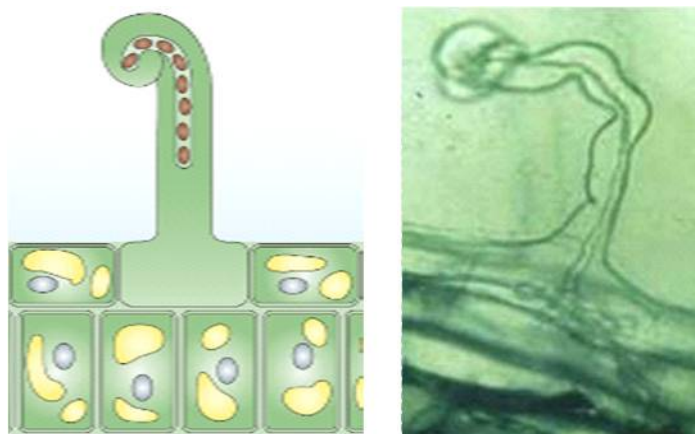


Figura 11. Esquema y microfotografía de la formación y desarrollo del canal de infección. Esquema adaptado de Jones *et al* 2007.

Los polisacáridos y proteínas producidos por los rizobios parecen jugar un papel importante en la formación y progresión del canal de infección. Así, la estructura de los EPS de *Rhizobium leguminosarum* interviene en la especificidad y en la formación de los canales de infección en su hospedador *Vicia sativa* (Laus *et al.*, 2005a; van Workum *et al.*, 1994). De forma similar, mutantes *exo⁻* de *Sinorhizobium meliloti* que tienen alterada la biosíntesis de succinoglicano (EPSI) forman canales de infección aberrantes en alfalfa y por tanto aparecen nódulos que apenas contienen bacteroides y son incapaces de fijar nitrógeno (Cheng y Walker, 1998) (Tabla 6). Sin embargo, los rizobios que establecen simbiosis con plantas que forman nódulos determinados, no parecen requerir la producción de EPS (Leigh y Coplin, 1992). Aún no se conoce el papel específico de los EPS de la bacteria en la iniciación del canal de infección, pero se cree que su función podría ser enmascarar la superficie bacteriana para evitar el desencadenamiento de una respuesta de defensa por parte de la planta (Niehaus y Becker, 1998).

4.1.5. Liberación de las bacterias en el nódulo y formación del simbiosoma (Infección secundaria).

Los canales de infección culminan en células diferenciadas de la región subyacente al meristemo nodular, en las que el ciclo celular está bloqueado (Figura 12). Cada célula, previa ruptura de la pared del canal de infección va captando las células bacterianas que se liberan del canal de infección. Este proceso de liberación se conoce como fenotipo Bar: **b**acterial **r**elease y en este trabajo también nos referiremos a él como proceso de infección secundaria. Una vez liberados, los rizobios alcanzan el ambiente endosimbiótico rodeados por membranas de origen vegetal, dando lugar a un nuevo orgánulo denominado simbiosoma (Brewin, 1991) (Figura 12 B).

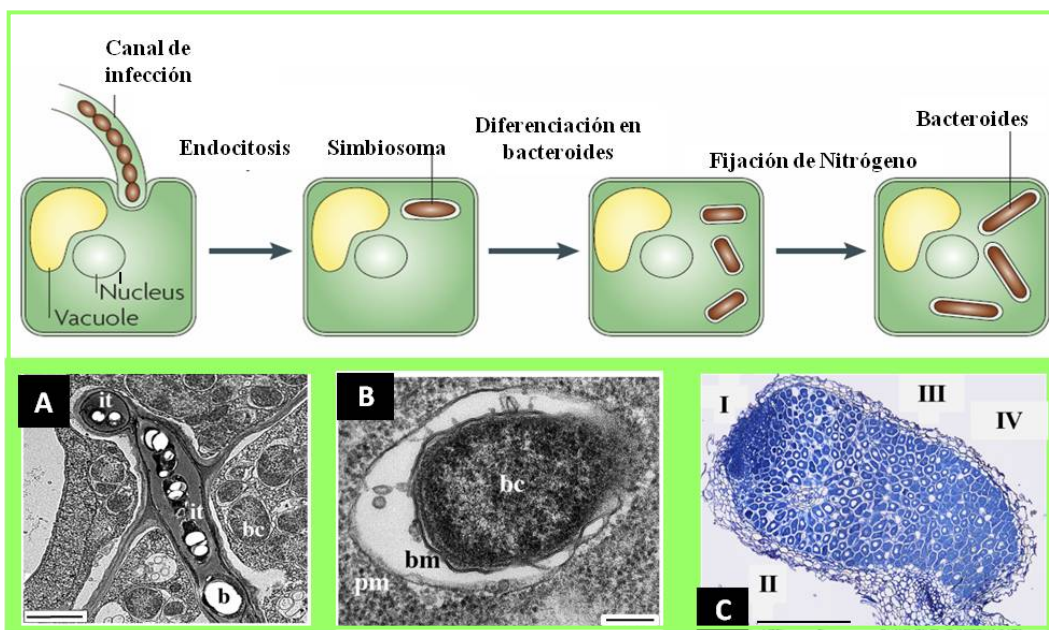


Figura 12. Esquema y fotografías tomadas con microscopía electrónica de transmisión (A, B) y de campo claro (C) de la liberación de las bacterias en el nódulo y diferenciación en bacteroides fijadores de nitrógeno. Esquema adaptado de Jones *et al* 2007. (A) Sección de un canal de infección atravesando dos células nodulares adyacentes (b, bacteria, id, infection droplet; it, infection thread) (B) simbiosoma en cuyo interior se encuentra un bacteroide fijador de nitrógeno de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii en trébol. (Bc, bacteroides; bm, membrana bacteroidea; pm, membrana peribacteroidea). (C) Sección longitudinal de un nódulo indeterminado en trébol blanco, mostrando las células no infectadas del córtex de la raíz, y varias zonas invadidas del interior (I: meristemo, II: zona de infección; III: zona de fijación y IV zona de senescencia). Escalas 2 μ m (A), 200 nm (B), 1 mm (C).

Se han identificado algunos mutantes bacterianos incapaces de liberarse del canal de infección y formar simbiosomas. *Sinorhizobium meliloti hemA*, presenta defectos en la biosíntesis de proteínas que albergan en su estructura grupos hemo, como proteínas del citocromo y otras implicadas en la sensibilidad al oxígeno, y por tanto es incapaz de diferenciarse en bacteroide (Gilles-González *et al.*, 1991; Kereszt *et al.*, 1995) (Tabla 6).

La membrana peribacteroidea (pm, Figura 12 B) que rodea al simbiosoma mantiene el límite entre la bacteria y el citoplasma de la célula vegetal y sirve de intercambio de señales y nutrientes entre ellas (Robertson y Lyttleton, 1984). Los nódulos inducidos por los rizobios en las leguminosas pueden ser de dos tipos: indeterminados o determinados. Los nódulos indeterminados se dan en plantas como las del género *Trifolium*, *Medicago*, *Pisum*, y *Vicia*. Estos nódulos tienen forma alargada ya que poseen un meristemo permanente, siendo las células del córtex interior las que se reintroducen en el ciclo celular. La actividad meristemática se establece en el ápice, causando un crecimiento del primordio hacia el exterior, mientras que las capas celulares inferiores se van diferenciando (Foucher y Kondorosi, 2000). Los nódulos determinados son inducidos en plantas de otros géneros entre los que se encuentran *Phaseolus*, *Glycine*, *Vigna* y *Lotus*. En esta clase de nódulos no hay un meristemo permanente sino que su

crecimiento se basa en la expansión, en vez de en la división celular, razón por la que presentan una morfología esférica.

En los nódulos indeterminados, la disposición de los rizobios define una serie de regiones en su interior (Hirsch, 1999) (Figura 12 C). La zona I o meristemática, que se localiza en el ápice del nódulo y donde se encuentran las células en proliferación. La zona II o de invasión, inmediatamente por debajo, donde se produce la invasión bacteriana. La zona III o de fijación, totalmente diferenciada en la que se realiza la fijación de nitrógeno y la zona IV o de senescencia en la base del nódulo, comprendida por células vegetales y bacterianas en degradación, y que se incrementa con la edad del mismo.

Las células procedentes de la zona meristemática que no son infectadas se especializan en distintos tipos celulares (Brewin, 1991). Algunas células de la endodermis del nódulo forman una monocapa con una pared altamente suberizada que impermeabiliza el parénquima central del nódulo frente a los gases. Otras células establecen una red que conecta el tejido central del nódulo con los haces vasculares, a través de la cual se transportan los sustratos carbonados a las células infectadas y se distribuyen al resto de la planta los compuestos nitrogenados generados en el nódulo (Scheres *et al.*, 1990).

4.1.6. Diferenciación en bacteroides fijadores de nitrógeno

La diferenciación de los bacteroides implica cambios morfológicos, bioquímicos e inducción del sistema enzimático nitrogenasa fijador de nitrógeno (fenotipo Fix: nitrogen **fix**ation) que llevará a cabo la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio, para ser asimilado por la planta. Entre los cambios morfológicos que experimentan los rizobios durante el proceso de diferenciación, se puede producir un aumento del tamaño original de cuatro a siete veces, como en el caso de *Sinorhizobium meliloti* (Figura 12), o bien la adquisición de forma de “Y”, como en el caso de *Rhizobium leguminosarum*. Recientemente, se ha descubierto que esta diferenciación en bacteroides fijadores de nitrógeno requiere la secreción de péptidos ricos en residuos de cisteína por parte de la planta que se introducen en el citosol de la célula bacteriana (Van de Velde *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010).

Los cambios bioquímicos que se producen en el bacteroide están encaminados a un silenciamiento de la mayor parte de los procesos metabólicos y un aumento de la expresión de los genes involucrados en la fijación de nitrógeno y la respiración. Este cambio en los patrones de expresión se ve inducido por reguladores transcripcionales como FixJ y FixK, que responden ante la deficiencia de oxígeno dentro del bacteroide (Fischer, 1994; Mesa *et al.*, 2008) (Tabla 6).

Entre los genes activados, se encuentran los genes *nif*, que codifican para el complejo enzimático nitrogenasa. Este complejo está formado por una molibdeno ferroproteína o nitrogenasa y una ferroproteína o nitrogenasa reductasa necesarias para que se lleve a cabo la fijación de N₂ (Fischer, 1994) (Tabla 6). En los bacteroides, el ATP necesario para la reducción del nitrógeno se produce en una fosforilación oxidativa acoplada a la cadena transportadora de electrones que utiliza oxígeno como aceptor final de los mismos (Imperial *et al.*, 1989). La

leghemoglobina es una hemoproteína férrica que se encarga de proteger a la nitrogenasa frente al oxígeno y de aportar este gas a la cadena transportadora de electrones.

El amonio que se produce se asimila mediante la formación de glutamina y es transportado a la planta en forma generalmente de asparraguina o alantoina. El equilibrio en el intercambio de metabolitos entre la planta y el microorganismo resulta vital para la simbiosis. Una alteración del mismo, producida por alguno de los dos miembros de la asociación, podría producir una acidificación en el interior del bacteroide que conduciría a la activación de las hidrolasas y por lo tanto a la muerte del simbiosoma y a la senescencia del nódulo (Gage, 2004).

4.2. Otras vías de infección

Como se expuso anteriormente, además de la ruta de entrada canónica a través de los pelos radicales, existen otras dos vías de entrada alternativas por las que el microsimbionte puede finalmente alcanzar el nódulo (Figura 7).

4.2.1. Entrada a través de grietas (“cracks”).

En el caso de algunas asociaciones simbióticas como las de los rizobios con leguminosas tropicales, la entrada se produce a través de “cracks” o fisuras ocasionadas por la emergencia de las raíces laterales, mecanismo que también es frecuente en plantas acuáticas como *Neptunia natans* (Figura 13 A). A partir de aquí, las bacterias pueden llegar directamente a las células del primordio nodular, como ocurre en la infección de *Arachis hypogaea* (cacahuete) por *Bradyrhizobium* (Van Rossum *et al.*, 1995) o bien, la invasión progresa de forma intercelular a intracelular por medio de canales de infección como en el caso de *Sesbania rostrata* y *Neptunia natans* (Subba-Rao *et al.*, 1995).

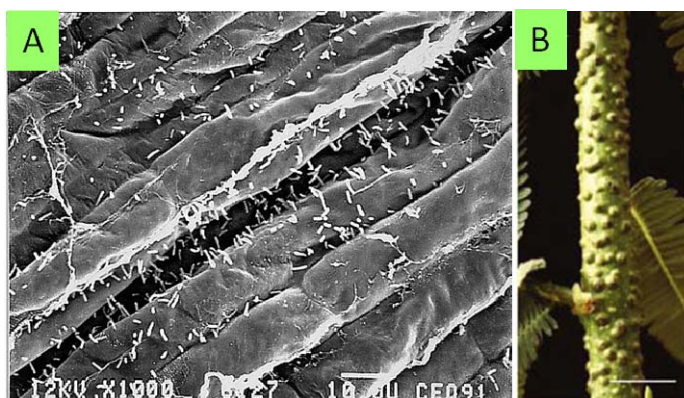


Figura 13. Mecanismos de entrada alternativos en rhizobia. A) Bacterias de *Devosia neptuniae* penetrando a través de una grieta en *T. repens* (Rivas *et al.*, 2002). B) Nódulos formados por *Bradyrhizobium* sp. en *Aeschynomene*, adaptado de (Masson-Boivin *et al.*, 2009). Escala 1 cm.

En ocasiones se produce un cambio en el modo de entrada de las bacterias en el interior de los nódulos por alguna característica ambiental, como es el caso de *Azorhizobium caulinodans*, que es capaz de infectar la planta acuática *Sesbania rostrata* por medio de pelos radicales pero también a través de estas fisuras intercelulares o “cracks” cuando la planta carece de pelos radicales en condiciones de encharcamiento (Capoen *et al.*, 2010; Goormachtig *et al.*, 2004).

4.2.2. Entrada a través de espacios intercelulares

Existe un tercer tipo de entrada independiente de la biosíntesis de los NF que recientemente ha sido corroborado por Madsen y colaboradores mediante plantas de *Lotus japonicus* que nodulan espontáneamente (por una mutación en la calmodulina receptora de los pulsos de calcio). Así, han observado que esta vía alternativa de entrada intercelular sin formación de canales de infección se puede producir en ausencia de los receptores del sistema de señalización de los factores de nodulación por parte de la planta, e incluso cuando son inoculadas con rizobios incapaces de sintetizar factores de nodulación funcionales (Madsen *et al.*, 2010). Estos autores además sugieren que este es un modo de entrada más arcaico que actualmente utilizan las bacterias cuando no puede establecerse el modo de entrada canónico a través del pelo radical, más complejo y regulado, pero más efectivo en la fijación de nitrógeno.

Este modo de infección coincide con el esperado por parte de dos especies de *Bradyrhizobium* fotosintéticos ORS278 y BTAi1 que infectan *Aeschynomene sensitiva* y *A. indica* pero en cuyos genomas no se han localizado los factores de nodulación (Giraud *et al.*, 2007). Aún así, el modo en que estas bacterias inducen la formación de los nódulos en la base del tallo de estas leguminosas (Figura 13 B), pese a que se cree que puede ser mediado por citoquininas, es aún desconocido.

4.3. Respuestas de defensa identificadas durante el proceso

Las plantas han desarrollado complejos mecanismos para defenderse durante el ataque de los microorganismos patógenos. Las rutas que siguen los mecanismos de defensa de las plantas están mediadas por distintos compuestos como el ácido salicílico (SA), especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico, ácido jasmónico o etileno. Estas mismas rutas de defensa también pueden ser activadas por las leguminosas cuando detectan la presencia de los rizobios (Ferguson, 2003). Sin embargo, son débiles, localizadas, transitorias e incluso necesarias en una interacción compatible, aunque pueden llegar a ser intensas si no lo es, llegando a abortar la infección.

Por ello, durante el establecimiento de una simbiosis compatible eficiente *Rhizobium*-leguminosa la bacteria debe penetrar en su hospedador evitando que se active la respuesta defensiva, ya que la producción por parte de la planta de estas

sustancias puede repercutir negativamente tanto en la nodulación como en la infección (Jones *et al.*, 2007; Stacey *et al.*, 2006). En *Rhizobium* los factores de nodulación juegan un papel importante en el reconocimiento específico de ambos simbiontes, participando también en el control de la respuesta defensiva de la planta, ya que suprimen la producción de SA y ROS (Shaw y Long, 2003). También se ha propuesto la intervención de los LPS de *Rhizobium* como supresores específicos de la respuesta defensiva (Tellstrom *et al.*, 2007).

Los rizobios comparten sistemas comunes en patógenos para evitar la respuesta de defensa como producción de antioxidantes, inhibidores de etileno y factores de virulencia específicos (Soto *et al.*, 2006). Por tanto, la planta responde a la infección de los rizobios tras el reconocimiento de los MAMPs (Microbe Associated Molecular Patterns) mostrando respuestas defensivas locales o transitorias similares a las que se producen durante la infección por parte de los patógenos, sugiriendo que *Rhizobium* es percibido como tal, aunque el sistema defensivo de la planta finalmente es controlado (Soto *et al.*, 2009).

4.3.1. Producción de ácido salicílico (SA)

El ácido salicílico es una molécula clave en los mecanismos de defensa de la planta. Actúa induciendo la expresión y secreción de proteínas relacionadas con los mecanismos de patogénesis, denominadas conjuntamente PRs, y a la adquisición de la resistencia sistémica adquirida por parte de la planta (Dong, 1998) en tejidos vegetales aunque no hayan estado previamente en contacto con el microorganismo invasor.

Durante la simbiosis, la planta acumula SA en la raíces cuando es inoculada con un *Rhizobium* que presenta una mutación que le impide sintetizar correctamente los factores de nodulación. Además, su adición exógena inhibe la nodulación (Martínez-Abarca *et al.*, 1998). Paralelamente, se ha demostrado que una reducción del nivel de SA endógeno es positiva para la infección y nodulación de plantas de *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula* (Stacey *et al.*, 2006). Todos estos resultados apuntan hacia que el control de la síntesis de SA por parte de la planta es necesario para que se establezca una simbiosis efectiva *Rhizobium*-leguminosa.

4.3.2. Acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

La producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno, también conocido como pulso oxidativo, modulan no sólo la respuesta defensiva sino también distintos procesos fisiológicos en las plantas como el crecimiento, el ciclo celular y la muerte celular programada, la señalización hormonal y la respuesta a estreses bióticos y abióticos.

Tiene un efecto en la regulación del crecimiento polar de los pelos radicales. Sin embargo, cuando los pelos entran en la etapa de madurez, esta respuesta decrece notablemente y desaparece en aquellos pelos radicales que ya

no están creciendo (Cárdenas *et al.*, 2008). Estos autores comprobaron que se produce una señal transitoria y localizada en la punta de los pelos radicales de la zona II tras la inoculación con NFs, que decrece a los niveles normales después de 1 minuto. Sin embargo, en los pelos de la zona I que se encuentran creciendo activamente, no pudo observarse este efecto. El H₂O₂ también ha sido localizado en los canales de infección, en los espacios intercelulares del córtex y en la pared celular de los espacios intercelulares de los nódulos, pero nunca en la zona fijadora de nitrógeno de éstos, probablemente por la producción de leghemoglobina (Chang *et al.*, 2009).

El papel de la producción de ROS durante la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa aún no está claro. Existen evidencias de que es necesaria una producción controlada de la respuesta ROS durante la infección por parte de los rizobios para que la simbiosis resulte efectiva (Cárdenas *et al.*, 2008; Jamet *et al.*, 2007; Ramu *et al.*, 2002). Pero, por otro lado, un intenso pulso oxidativo como el detectado en canales de infección abortados en plantas de alfalfa (Vasse *et al.*, 1993) o la acumulación de H₂O₂ detectada en respuesta a rizobios incompatibles (Bueno *et al.*, 2001) puede interferir con la infección por parte de los rizobios. También se ha detectado la producción de ROS en nódulos senescentes (Rubio *et al.*, 2004).

5. IMPLICACIÓN DE ENZIMAS DEGRADATIVOS DE LA PARED CELULAR VEGETAL EN LA INFECCIÓN

Como se ha expuesto en el apartado anterior, la infección de las plantas leguminosas por los rizobios es un proceso extremadamente complejo y regulado, en el que el microsimbionte debe atravesar una barrera sólida, la pared celular vegetal. A continuación, a través del canal de infección, alcanza el nódulo donde, una vez liberado, se diferenciará en su forma endosimbionte fijadora de nitrógeno.

El proceso por el cual los rizobios pasan de ocupar la cavidad en la que han quedado atrapados tras la producción del “curling” a entrar en el interior de la planta formando el canal de infección ha sido objeto del planteamiento de diferentes hipótesis y de numerosos estudios en los últimos años. Sin embargo, el mecanismo específico por el que se produce esta entrada y las moléculas implicadas en ella aún no se conocen con exactitud.

5.1. Entrada de *Rhizobium* en la planta. ¿Degradación o invaginación de la pared celular?

Estudios microscópicos han confirmado que los canales de infección comienzan en aquellos pelos radicales que han sufrido la curvatura, o bien en las intersecciones de pelos bifurcados o en las uniones entre dos pelos (Higashi y Abe, 1980). Se han propuesto varias hipótesis que intentan explicar cómo se produce la entrada de la bacteria en la planta.

En 1956 Nutman elaboró una teoría por la que proponía que el comienzo del canal de infección se producía por una invaginación de la pared celular del pelo radical debido a su reorientación hacia las células corticales de la raíz, con una posterior endocitosis de la bacteria (Nutman, 1956). Esta teoría supone que no hay penetración propiamente dicha de la pared celular y que, teóricamente, la bacteria, incluso en el canal de infección, permanece todavía en el exterior del citoplasma de la célula vegetal.

Los primeros estudios de microscopía electrónica de transmisión sobre el proceso de infección en la simbiosis rizobio-leguminosa mostraban la continuidad entre la pared celular del canal de infección y el pelo radical, concluyendo que no se produce una penetración física de la bacteria en éste, apoyando la teoría de la invaginación de la pared celular (Napoli *et al.*, 1975; Sahlman, 1963).

Por otro lado, Ljunggren y Fähræus en 1961 propusieron otra hipótesis basada en la síntesis de nueva pared celular tras la degradación localizada del pelo radical en el lugar de la infección (Ljunggren y Fähræus, 1961). Para ello, se basaron en observaciones según las cuales los enzimas pectinolíticos (poligalacturonasas), constitutivos de las raíces de leguminosas, producían un aumento en su actividad únicamente cuando la planta era inoculada con cepas de rizobios capaces de establecer simbiosis con ellas. Esta inducción daría lugar al debilitamiento de la pared celular en el sitio de infección facilitando la entrada de la bacteria. Esta teoría, por tanto, establece la hidrólisis como mecanismo de entrada, aunque postula el origen vegetal de los enzimas responsables de la misma, apoyándose en la capacidad de las plantas de degradar o alterar la composición de sus propias paredes celulares, por ejemplo durante el alargamiento del tubo polínico. Sin embargo, varios autores fueron incapaces de reproducir los resultados obtenidos por Ljunggren y Fähræus (Lillich y Elkan, 1968; Macmillan y Cooke, 1969).

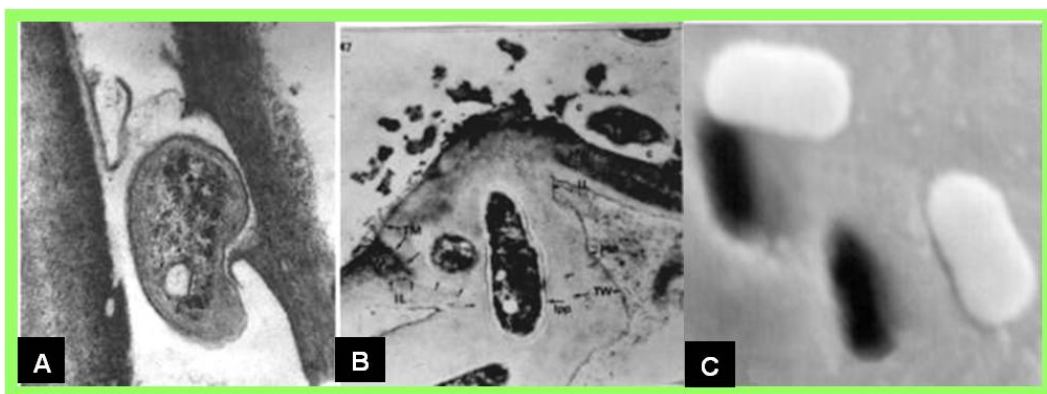


Figura 14. Estudios de microscopía electrónica que muestran la hidrólisis localizada de la pared celular vegetal en el punto de entrada de la bacteria en la planta (A, B) y pequeños “pits” en la pared del pelo radical (C). Microfotografías A y C tomadas de Mateos *et al* (2001). La microfotografía B aparece en Callaham y Torrey (1981).

La mejora sustancial de las técnicas utilizadas en microscopía electrónica permitió a los investigadores dar una nueva interpretación al proceso en estudios posteriores (Callaham y Torrey, 1981; Higashi y Abe, 1980; Ridge y Rolfe, 1985;

Turgeon y Bauer, 1985). Por un lado confirmaron la existencia de continuidad entre la pared celular vegetal y el canal de infección, y por otro descartaron la hipótesis de la invaginación, ya que observaron que en todos los puntos de infección primaria se producía la degradación de la matriz de la pared celular de la punta del pelo radical, justo donde la bacteria se encontraba unida a la planta (Figura 14 A, B). También observaron que, simultáneamente, se produce la síntesis de nueva pared celular a partir de la deposición de material del citoplasma de la célula vegetal rodeando la zona donde se ha producido la degradación y englobando a las bacterias que han atravesado la pared celular. Esta nueva pared celular seguirá creciendo dando lugar a la génesis del canal de infección.

Esta interpretación apoya la segunda hipótesis, consistente en la hidrólisis de la pared celular, pero introduce un nuevo punto de divergencia centrado en cuál de los dos, la planta o la bacteria, es la responsable de la producción de enzimas hidrolíticos encargados de llevar a cabo la degradación. Algunos autores se inclinan por el origen bacteriano de estos enzimas, sugiriendo su producción de forma muy localizada y regulada para facilitar la entrada del simbiote sin provocar la lisis celular (Callaham y Torrey, 1981; Higashi y Abe, 1980). Sin embargo, esta nueva teoría no cobrará fuerza hasta que no se esclarezca la capacidad de los rizobios de sintetizar enzimas hidrolíticos de la pared celular vegetal.

5.2. Producción de celulasas y pectinasas en los rizobios

La implicación de los enzimas que degradan la pared celular vegetal producidos por los rizobios durante el proceso de infección de una leguminosa ha sido una hipótesis de trabajo sin resolver durante mucho tiempo debido a que la producción de estos enzimas es relativamente baja y no se excretan al medio. Además, las técnicas para la detección y cuantificación de estos enzimas disponibles hasta hace unos años eran poco sensibles.

Los rizobios poseen enzimas capaces de degradar la celulosa y otros polisacáridos presentes en la pared celular vegetal. Utilizando la técnica cualitativa de difusión en placas de agar con diversos sustratos y viscosimetría se puso de manifiesto la capacidad de distintas cepas de rizobios de producir pectinasas (Hubbell *et al.*, 1978), hemicelulasas y celulasas (Martinez-Molina *et al.*, 1979). La actividad observada era casi nula en los sobrenadantes crudos, pero pudo ser cuantificada en extractos celulares obtenidos por ruptura de las células con ultrasonidos.

Varios trabajos posteriores han puesto a punto métodos dotados de mayor sensibilidad que han servido de base para confirmar y poder comparar la producción de celulasas y pectinasas por los rizobios (Angle, 1986; Finnie *et al.*, 1998; Iannetta *et al.*, 1997; Jiménez-Zurdo *et al.*, 1996a; Mateos *et al.*, 1992; Michaud *et al.*, 2002; Morales *et al.*, 1984; Plazinski y Rolfe, 1985).

Cabe destacar la puesta a punto en 1992 de diferentes métodos, más sensibles que los convencionales, para detectar actividades hidrolíticas de los polisacáridos que componen la pared celular vegetal, que han conseguido superar

la barrera que suponía la detección fiable de estos enzimas producidos por los rizobios (Mateos *et al.*, 1992). Utilizando estos métodos, se realizó un estudio comparativo de la producción de celulasas y pectinasas por los microorganismos que nodulan leguminosas, demostrando la producción de actividad carboximetilcelulásica en todas las cepas tipo de las especies ensayadas (*Rhizobium leguminosarum* biovariedades trifolii, phaseoli y viciae, *Bradyrhizobium japonicum*, *Mesorhizobium loti* y *Sinorhizobium meliloti*) (Jiménez-Zurdo *et al.*, 1996a). Los perfiles electroforéticos de los extractos sonicados se sometieron a un revelado de actividad CMC-asa, dando como resultado una heterogeneidad en el patrón de isoenzimas producidos por las distintas cepas. Por el contrario, sólo se detectó actividad poligalacturonasa en *R. leguminosarum* bv. trifolii y *S. meliloti*. El hecho de que todos los rizobios ensayados produzcan celulasas apoya la hipótesis de una implicación de estos enzimas en la simbiosis.

Así mismo, otros autores han relacionado de una forma indirecta estos enzimas con el proceso de infección (Callaham y Torrey, 1981; Chalifour y Benhamou, 1989; Martínez-Molina *et al.*, 1979; Mateos *et al.*, 2001; Verma *et al.*, 1978). Los estudios realizados por Mateos *et al.* (2001) mediante microscopía electrónica demostraron que *R. leguminosarum* y *S. meliloti* inducen la formación de erosiones localizadas denominadas “pits” en la superficie de las raíces de sus hospedadores de forma específica (Figura 14 C). Estos orificios coinciden con la proyección de la interfase de contacto entre el microorganismo y la planta ya que poseen el mismo tamaño y forma que las bacterias, indicando que los enzimas que las producen están unidas a la célula y no son secretadas (Mateos *et al.*, 2001). Sin embargo, no llegan a progresar en el interior de la planta sino que se producen sólo en la superficie, dejando al microorganismo en la parte externa de la pared de las células de la epidermis (Figura 14 C).

5.3. Detección de las celulasas producidas por *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii

Rhizobium leguminosarum bv. trifolii es, hasta la fecha, el microsimbionte productor de este tipo de enzimas mejor estudiado. Utilizando distintas técnicas Morales *et al.* (1984) estudiaron la producción de celulasas por diferentes cepas de *R. leguminosarum* bv. trifolii, llegando a la conclusión de que la producción de estos enzimas era inducida por una variedad de exopolisacáridos entre los que se encuentran la celulosa y la hemicelulosa, así como por los exudados radicales del trébol, que estimulaban moderadamente la producción de celulasas por dichas bacterias. Incluso llegaron a hacer un primer intento de caracterización de estos enzimas que reveló que se tratan de endoglucanasas. Sin embargo, no encontraron ninguna correlación entre la infectividad de las distintas cepas estudiadas y la actividad celulolítica (Morales *et al.*, 1984).

Mateos *et al.* en 1992 comprobaron que la cepa silvestre *R. leguminosarum* biovar trifolii ANU843 produce dos isoenzimas con actividad celulásica (denominadas C1 y C2) y uno con actividad pectinásica (P). Estos isoenzimas están unidos a la célula, ya que su actividad sólo se detecta en los

extractos obtenidos tras el tratamiento con lisozima y EDTA o por sonicación, pero nunca en el medio extracelular de cultivo. Por otro lado, se expresan de forma constitutiva cuando crecen en un medio definido y tienen una masa molecular aproximada de 41,5 (C1) y 31,5 (C2) kDa y un punto isoeléctrico de 7,2 (P). Posteriormente se confirmó la presencia de enzimas con actividad celulolítica en otras cepas de los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium* (Jiménez-Zurdo *et al.*, 1996a; Mateos *et al.*, 1992).

Mediante el uso de cepas derivadas de ANU843: ANU851 (con una inserción Tn5 en el gen *nod D*), ANU845 (cepa “curada” del plásmido simbiótico pSym), ANU845pRt032 (cepa recombinante que contiene la región *nod* dentro del plásmido pRt032 que ha sido introducido en la cepa “curada” del pSym ANU845) estos autores también han comprobado que el plásmido simbiótico pSym está implicado en la producción de la celulasa C1, pero no en la de la celulasa C2 (Jiménez-Zurdo *et al.*, 1996b).

Una vez detectadas estas actividades enzimáticas se procedió a la separación y aislamiento de las celulasas C1 y C2 y la pectinasa P producidas por *R. leguminosarum* biovar *trifolii* ANU843 mediante cromatografía de intercambio aniónico, separando dos picos con actividad celulásica a 0,1M (C1) y 0,2M (C2) de NaCl y un pico con actividad pectinásica a 0,15M (P) de NaCl (Mateos *et al.*, 2001). Con los extractos obtenidos se procedió al estudio microscópico comparativo del efecto biológico de las celulasas y de la pectinasa producidas por *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 sobre raíces axénicas de trébol (*Trifolium repens* L.) (Figura 15). Para ello, se pusieron en contacto con los pelos radicales, donde no se observó ninguna alteración cuando fueron utilizadas las fracciones correspondientes a la pectinasa P y la celulasa C1. Sin embargo, la fracción correspondiente a la celulasa C2 produjo una degradación de la pared celular en el ápice del pelo radical (Mateos *et al.*, 2001).

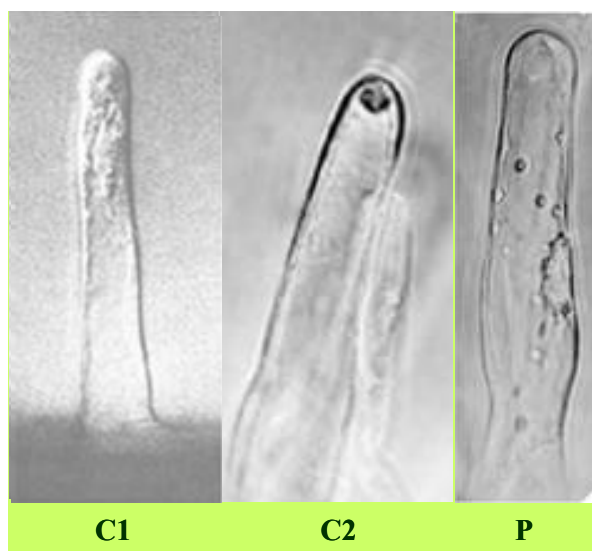


Figura 15. Efecto biológico de los enzimas hidrolíticos de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* sobre *Trifolium repens* (celulasas C1 y C2 y pectinasa P).

5.4. Caracterización *in vitro* de la celulasa CelC2: el fenotipo Hot

Una vez observada su actividad diferencial respecto a los otros enzimas hidrolíticos, se procedió a la purificación de la celulasa C2 producida por *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii ANU843. El proceso se abordó utilizando diversas técnicas cromatográficas (intercambio iónico, exclusión molecular e interacción hidrofóbica). Finalmente, se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE y se revelaron las distintas bandas proteicas mediante tinción de plata. Así se observó que en el último paso de purificación se había obtenido una única banda con actividad CMC-asa.

A continuación se procedió a su caracterización bioquímica, encontrando que la celulasa CelC2 es una 1,4-β-D-endoglucanasa con una masa molecular de 33,2 Kd. Posee especificidad de sustrato para celulosa no cristalina, que coincide con la composición del extremo terminal de los pelos radicales, como indican estudios de microscopía de luz polarizada, que permiten distinguir las regiones cristalinas de la pared celular vegetal, de las zonas no cristalinas isotrópicas (Figura 16 A). Además presenta un pH óptimo de actividad de 5,0, una temperatura óptima de 40° C y una constante Km de 89,4 mg/ml en la hidrólisis del sustrato, carboximetilcelulosa (Robledo *et al.*, 2008).

Usando de nuevo microscopía óptica se llevó a cabo la monitorización del efecto de la celulasa C2 purificada sobre raíces axénicas de trébol. La celulasa C2 purificada produce una degradación de la pared celular en el ápice del pelo radical permitiendo la liberación de material citoplásmico a las 2 horas de ser aplicada. Al cabo de aproximadamente 8 horas se puede observar un agujero en el ápice del pelo radical, de una forma muy localizada, únicamente en el ápice isotrópico no cristalino de la punta del pelo radical (Figura 16 B), que es justo el sitio por donde penetra la bacteria en la planta iniciando el proceso endosimbiótico fijador de nitrógeno.

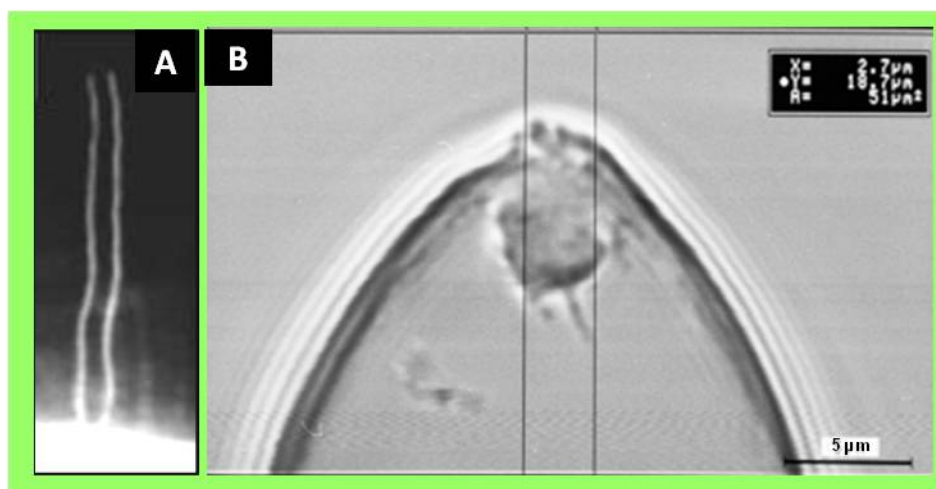


Figura 16. Microscopía de luz polarizada del pelo radical (A) y microfotografía del fenotipo Hot (B). Mateos *et al.* (2001).

Estos resultados han favorecido la definición de un nuevo fenotipo en el proceso de infección rizobio-leguminosa denominado fenotipo Hot (haciendo referencia a las siglas **H**ole **o**n the tip). En *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ANU843 la celulasa C2 es la responsable del “Hot” en el proceso de infección en trébol. El orificio mide entre dos y tres micrómetros de diámetro, que serían suficientes para permitir la entrada del microorganismo en la planta (Mateos *et al.*, 2001) (Figura 16 B).

Además, la degradación se ve favorecida por la presencia en el medio, de factores de nodulación de trébol purificados, sugiriendo una posible complementariedad entre las celulasas producidas por la bacteria y los NF en la creación de portales de entrada necesarios para una infección primaria eficiente. Por otro lado, cuando se aplica exógenamente el mismo enzima a las raíces de alfalfa (hospedadora habitual de *Sinorhizobium meliloti*) no se observa ningún efecto lo que sugiere una posible especificidad de hospedador (Mateos *et al.*, 2001).

Por tanto, a la vista de estos resultados parece que la celulasa CelC2 puede estar implicada en el proceso de infección de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii y su hospedador habitual, *Trifolium repens*. Sin embargo, es necesario profundizar en su análisis y estudio tanto a nivel molecular como *in vivo* para intentar confirmar definitivamente el papel que juega en el establecimiento de esta simbiosis de gran importancia tanto ecológica como económica.

OBJETIVOS

La simbiosis rizobia-leguminosa comienza con el intercambio de señales bioquímicas diversas que determinan la progresión del proceso infectivo, muy regulado y complejo, que culmina con la formación en la planta de una estructura altamente organizada (nódulo), donde la bacteria se diferenciará en su forma endosimbionte fijadora de nitrógeno atmosférico (bacteroide) para que pueda ser asimilado por el vegetal. El establecimiento de una endosimbiosis eficiente implica que se lleve a cabo satisfactoriamente la adhesión y penetración de la bacteria en la planta manteniendo su integridad de forma que no se aborte el proceso infectivo y así el microorganismo pueda llegar hasta el nódulo, por lo que pueden considerarse etapas críticas en la interacción mutualista.

Existen evidencias de que las sustancias responsables de la degradación de la pared celular sean enzimas hidrolíticos de sus componentes polisacáridicos. Los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación sugieren que la celulasa CelC2 de la cepa ANU843 de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii puede intervenir en el proceso de infección de *Trifolium repens*. La capacidad de otros rizobios de sintetizar estos enzimas así como el efecto que produce la inoculación de plantas leguminosas con cepas alteradas en la producción de esta celulasa sobre la infección, la nodulación y la capacidad de fijar nitrógeno es desconocido. Tampoco se conoce qué papel juega la endoglucanasa CelC2 en la biosíntesis de celulosa por parte del microorganismo.

Por tanto, con el objetivo general de investigar el papel de la celulasa CelC2 en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, se han establecido los siguientes objetivos concretos de este trabajo de investigación:

1. Análisis de la presencia de enzimas celulolíticos y de la capacidad de sintetizar celulosa en distintas cepas de microorganismos que nodulan leguminosas.
2. Amplificación y caracterización molecular del gen que codifica para la celulasa CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii y del operón involucrado en la biosíntesis de celulosa.
3. Análisis del grado de conservación y las relaciones filogenéticas del gen *celC* entre las especies de microorganismos que nodulan leguminosas.
4. Obtención de mutantes de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii no productores (knockout) y superproductores la celulasa CelC2.

5. Caracterización funcional del gen mediante el análisis de las diferentes etapas del proceso simbiótico de infección en *Trifolium repens* con las cepas mutantes obtenidas.
6. Análisis de marcadores de respuesta defensiva en la planta y ensayos de competitividad durante el proceso de infección con cepas superproductoras del enzima CelC2.
7. Obtención de una cepa de *Sinorhizobium meliloti* 1021 que exprese de forma heteróloga el gen *celC* y evaluación de las propiedades simbióticas del mutante obtenido mediante su inoculación en distintas leguminosas.
8. Estudio de la implicación de la celulasa CelC2 en las cascadas de señalización *Rhizobium*-leguminosa.
9. Caracterización de la implicación de la celulasa CelC2 en la biosíntesis de celulosa, la colonización de las raíces y la formación de biofilms en *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

1.1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio

1.1.1. Cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*

La mayor parte del trabajo expuesto a lo largo de esta memoria fue realizado con la cepa ANU843, cedida por el grupo de interacciones planta-microorganismo, Research School of Biological Sciences, The Australian National University (Canberra, Australia). Esta cepa ha sido ampliamente utilizada en trabajos relacionados con el proceso de infección de los rizobios en leguminosas.

También se utilizó la cepa E11 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, endófito aislado de raíces de arroz en el delta del Nilo (Yanni *et al.*, 1997) con capacidad de nodular y fijar nitrógeno en trébol y que además tiene potencial para promover el crecimiento del arroz y mejorar su productividad debido a factores que promueven el crecimiento vegetal. Fue cedida por el grupo de investigación de Youssef G. Yanni, en la Sakha Agricultural Research Station (Kafr El-Sheikh, Egipto). La siguiente tabla recoge sus características más relevantes, así como las de las cepas recombinantes derivadas a partir de ella.

Tabla 7. Cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* utilizadas en este trabajo

| CEPA | CARACTERÍSTICAS RELEVANTES | REFERENCIA |
|---------------------------|--|------------------------------|
| ANU843 | Cepa Silvestre. Nod ⁺ Fix ⁺ | (Rolfe <i>et al.</i> , 1980) |
| ANU843ΔC2 | Delección de 361 pb en el gen <i>celC</i> ($\Delta celC$). | Este trabajo |
| ANU843ΔC2comp | Derivada de ANU843ΔC2. Contiene pJZC2; km ^r . | Este trabajo |
| ANU843EV | Derivada de ANU843. Contiene pBBR1MCS-2 vacío; km ^r . | Este trabajo |
| ANU843C2 ⁺ | Contiene pJZC2; km ^r . (<i>celC</i> ⁺) | Este trabajo |
| ANU843GUS | Derivada de ANU843. Contiene pGUS3; km ^r | Este trabajo |
| ANU843GFP | Derivada de ANU843. Contiene pHC60 (<i>gfp</i>). Tc ^r | Este trabajo |
| ANU843ΔC2GFP | Derivada de ANU843ΔC2. Contiene pHC60 (<i>gfp</i>). Tc ^r | Este trabajo |
| ANU843C2 ⁺ GFP | Derivada de ANU843C2 ⁺ . Contiene pHC60. (<i>gfp</i>) km ^r , Tc ^r | Este trabajo |
| E11 | Cepa Silvestre. Nod ⁺ Fix ⁺ . | (Yanni <i>et al.</i> , 1997) |
| E11C2 ⁺ | Contiene pJZC2; km ^r . (<i>celC</i> ⁺). | Este trabajo |

1.1.2. Cepas de *Sinorhizobium meliloti*

Esta cepa también se utilizó a lo largo de una parte del trabajo de esta memoria. Fue cedida por el grupo de Ecología Genética de la Rizosfera, Estación Experimental del Zaidín, CSIC (Granada). La siguiente tabla recoge sus características más relevantes, así como las de las cepas mutantes derivadas a partir de ella:

Tabla 8. Cepas de *Sinorhizobium meliloti* 1021 utilizadas en este trabajo

| CEPA | CARACTERÍSTICAS RELEVANTES | REFERENCIA |
|-------------------------|--|------------------------------|
| 1021 | Derivada de 2011. Cepa Silvestre. Nod ⁺ , Fix ⁺ ; Sm ^f | (Meade <i>et al.</i> , 1982) |
| 1021C2 ⁺ | Contiene pJZC2; Sm ^f , km ^f (<i>celC</i> ⁺) | Este trabajo |
| 1021GFP | Derivada de 1021. Contiene pHC60 (<i>gfp</i>). Sm ^f , Tc ^f | Este trabajo |
| 1021C2 ⁺ GFP | Derivada de 1021C2 ⁺ . Contiene pHC60. (<i>gfp</i>) Sm ^f , km ^f , Tc ^f | Este trabajo |

1.1.3. Otras cepas de microorganismos que nodulan leguminosas

En este trabajo, se utilizaron varios microorganismos aislados por nuestro grupo de investigación como cepas representativas de biovariedades:

Tabla 9. Aislados representativos de diferentes biovariedades del género *Rhizobium*:

| ESPECIE | CEPA | PLANTA HOSPEDADORA | BIOVARIEDAD |
|--------------------------------|------------|--------------------|-------------|
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> | ATCC 14480 | <i>Trifolium</i> | trifolii |
| | RVS03 | <i>Vicia</i> | viciae |
| | USDA 2370 | <i>Pisum</i> | viciae |
| | RPVF18 | <i>Phaseolus</i> | phaseoli |
| <i>Rhizobium</i> sp. | RPVR32 | <i>Phaseolus</i> | phaseoli |
| <i>Rhizobium etli</i> | Mim- 2 | <i>Mimosa</i> | mimosae |
| <i>Rhizobium</i> sp. | RTP05 | <i>Trifolium</i> | trifolii |
| <i>Rhizobium</i> sp. | CVIII14 | <i>Vicia</i> | viciae |
| <i>Rhizobium gallicum</i> | PhD12 | <i>Phaseolus</i> | phaseoli |
| <i>R. giardini</i> | RPA12 | <i>Phaseolus</i> | phaseoli |
| <i>Rhizobium tropici</i> | Br859 | <i>Phaseolus</i> | phaseoli |
| <i>Rhizobium rhizogenes</i> | 163C | * | |
| | K84 | * | |

*Especies cuya capacidad de nodulación no ha sido descrita, incluidas en géneros tradicionalmente considerados rhizobia.

Además se utilizaron 55 cepas tipo de diversas especies de rhizobia procedentes de las colecciones de cultivo como cepas de referencia.

Tabla 10. Cepas tipo de microorganismos que establecen simbiosis con leguminosas y afines. *Especies cuya capacidad de nodulación no ha sido descrita, incluidas en géneros tradicionalmente considerados rhizobia.

| GÉNERO | CEPA | PLANTA HOSPEDADORA | |
|--|---|--|-----------------|
| <i>Rhizobium</i> | <i>R. alarii</i> GBV016 ^T | * | |
| | <i>R. cellulosilyticum</i> ALA10B2 ^T | <i>Medicago</i> | |
| | <i>R. etli</i> CFN 42 ^T | <i>Phaseolus</i> | |
| | <i>R. fabae</i> 23997 ^T | <i>Phaseolus</i> | |
| | <i>R. galegae</i> ATCC 43677 ^T | <i>Galega</i> | |
| | <i>R. gallicum</i> R602sp ^T | <i>Phaseolus</i> | |
| | <i>R. giardinii</i> H152 ^T | <i>Phaseolus</i> | |
| | <i>R. hainanense</i> I66 ^T | <i>Desmodium</i> | |
| | <i>R. huautlense</i> SO2 ^T | <i>Sesbania</i> | |
| | <i>R. indigoferae</i> CCBAU 71042 ^T | <i>Indigofera</i> | |
| | <i>R. leguminosarum</i> ATCC10004 ^T | <i>Pisum</i> | |
| | <i>R. loessense</i> CCBAU 7190B ^T | <i>Astragalus</i> | |
| | <i>R. lusitanum</i> P1-7 ^T | <i>Phaseolus</i> | |
| | <i>R. mongolense</i> USDA 1844 ^T | <i>Medicago</i> | |
| | <i>R. radiobacter</i> ATCC 19358 ^T | * | |
| | <i>R. rhizogenes</i> ATCC 11325 ^T | <i>Phaseolus</i> | |
| | <i>R. sullae</i> IS123 ^T | <i>Hedysarum</i> | |
| | <i>R. rubi</i> ATCC 13335 ^T | * | |
| | <i>R. phaseoli</i> ATCC 14482 ^T | <i>Phaseolus</i> | |
| | <i>R. pisi</i> DSM 30132 ^T | <i>Pisum</i> | |
| | <i>R. tibeticum</i> CCBAU85039 ^T | <i>Trigonella</i> | |
| | <i>R. tropici</i> CIAT 899 ^T | <i>Phaseolus</i> | |
| | <i>R. undicola</i> LMG 11875 ^T | <i>Neptunia</i> | |
| <i>R. vitis</i> ATCC 49767 ^T | * | | |
| <i>R. yanglingense</i> CCBAU 71623 ^T | <i>Amphicarpaea</i> | | |
| <i>Sinorhizobium</i> | <i>S. arboris</i> LMG 14919 ^T | <i>Acacia</i> | |
| | <i>S. fredii</i> LMG 6217 ^T | <i>Glycine</i> | |
| | <i>S. kostiense</i> LMG 19227 ^T | <i>Acacia</i> | |
| | <i>S. meliloti</i> ATCC 9930 ^T | <i>Medicago</i> | |
| | <i>S. medicae</i> LMG1037 ^T | <i>Medicago</i> | |
| | <i>S. medicae</i> WSM419 | <i>Medicago</i> | |
| | <i>S. morelense</i> Lc04 ^T | * | |
| | <i>S. sahelii</i> LMG7837 ^T | <i>Acacia</i> | |
| | <i>S. terangaie</i> LMG6463 ^T | <i>Acacia</i> | |
| | <i>S. xinjiangense</i> LMG17930 ^T | <i>Glycine</i> | |
| | <i>Mesorhizobium</i> | <i>M. amorphae</i> ACCC 19665 ^T | <i>Amorpha</i> |
| | | <i>M. chacoense</i> Pr5 ^T | <i>Prosopis</i> |
| | | <i>M. ciceri</i> USDA 3383 ^T | <i>Cicer</i> |
| <i>M. huakuii</i> USDA 4779 ^T | | <i>Astragalus</i> | |
| <i>M. loti</i> ATCC 33669 ^T | | <i>Lotus</i> | |
| <i>M. mediterraneum</i> USDA 3392 ^T | | <i>Cicer</i> | |
| <i>M. plurifarium</i> LMG 7836 ^T | | <i>Acacia</i> | |
| <i>M. septentrionale</i> HAMB1 2582 ^T | | <i>Astragalus</i> | |
| <i>M. tianshanense</i> LMG 18976 ^T | | <i>Sophora</i> | |
| <i>M. temperatum</i> HAMB1 2583 ^T | | <i>Astragalus</i> | |
| <i>Phyllobacterium</i> | <i>P. trifolii</i> pETPO2 ^T | <i>Trifolium</i> | |
| <i>Bradyrhizobium</i> | <i>B. betae</i> pl7Hg ^T | * | |
| | <i>B. canariense</i> BTA1 ^T | <i>Chamaecytisus</i> | |
| | <i>B. elkanii</i> LMG 6134 ^T | <i>Glycine</i> | |
| | <i>B. japonicum</i> LMG 6138 ^T | <i>Glycine</i> | |
| | <i>B. liaoningense</i> LMG 18230 ^T | <i>Glycine</i> | |
| | <i>B. yuanmingense</i> LMG 21827 ^T | <i>Lespedeza</i> | |
| <i>Azorhizobium</i> | <i>A. caulinodans</i> ORS 571 ^T | <i>Sesbania</i> | |
| <i>Devosia</i> | <i>D. neptuniae</i> J1 ^T | <i>Neptunia</i> | |
| <i>Ochrobactrum</i> | <i>O. lupini</i> LUP21 ^T | <i>Lupinus</i> | |
| | <i>O. triciti</i> LMG18957 ^T | <i>Cytisus</i> | |

1.1.4. Cepas de *Escherichia coli*

La cepa silvestre de *E. coli* DH5 α (Sambrook *et al.*, 1989) fue la utilizada para la replicación y transferencia de los plásmidos empleados, a excepción del plásmido pHC60, que fue movilizado a través de la cepa S 17.1 (Sp^r/Sm^r) (Simon *et al.*, 1983).

1.2. Condiciones de cultivo

1.2.1. Medios utilizados

El cultivo habitual de los microorganismos en el laboratorio se llevó a cabo en medio YMB (Yeast Manitol Broth) o medio TY (Tryptone Yeast) cuya composición es la siguiente:

| Composición Medio YMB | g/l |
|---|-----|
| Manitol (Panreac) | 7,0 |
| Extracto de levadura (Difco)* | 2,0 |
| K ₂ HPO ₄ (Panreac) | 0,2 |
| MgSO ₄ . 7H ₂ O (Panreac) | 0,2 |

| Composición TY | g/l |
|-------------------------------|-----|
| Triptona peptona (Difco) | 5,0 |
| Extracto de levadura (Difco)* | 3,0 |
| CaCl ₂ (Codex) | 0,5 |

* Se utilizó extracto de levadura obtenido por autólisis en lugar de por estrés salino ya que la cepa de estudio tiene una alta sensibilidad por las sales presentes en el medio.

Para preparar medios sólidos se añadió Agar (CONDA) al 1,5% (p/v), en este caso el medio YMB se denominó YMA (Yeast Manitol Agar). Los medios fueron esterilizados a 121 °C durante 15 min antes de su utilización.

En algunos ensayos en los que era necesario utilizar un medio definido, como los procesos de selección de los transconjugantes obtenidos por conjugación triparental, se preparó el Medio Mínimo sólido para *Rhizobium* (O'Gara y Shanmugam, 1976) modificado:

| Composición Medio mínimo | g/l |
|---|------|
| K ₂ HPO ₄ (Panreac) | 0,3 |
| KH ₂ PO ₄ (Panreac) | 0,3 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O (Panreac) | 0,15 |
| CaCl ₂ X 2H ₂ O(CODEX) | 0,05 |
| NaCl (Panreac) | 0,1 |
| NH ₄ NO ₃ (Prolabo) | 0,1 |
| Manitol | 10,0 |

El medio mínimo se ajustó a pH 7,0 con K₂HPO₄ o KH₂PO₄ y después de su esterilización se agregaron las cantidades necesarias de las soluciones de vitaminas (1 ml/l) y elementos traza (1ml/l).

| Composición solución vitaminas | mg/l |
|--------------------------------|-------|
| Riboflavina | 20,0 |
| Ácido P-amino benzoico | 20,0 |
| Ácido nicotínico | 20,0 |
| Biotina | 20,0 |
| Tiamina-HCl | 20,0 |
| Piridoxina-HCl | 20,0 |
| Pantotenato cálcico | 20,0 |
| Inositol | 120,0 |

Para la preparación de la solución de vitaminas, los ingredientes se disolvieron en regulador Na₂HPO₄ 0,05M (pH 7,0) y se esterilizaron mediante filtración. Todas las vitaminas empleadas son de la casa comercial Fluka.

| Composición Solución de elementos traza | mg/l |
|---|-------|
| H ₃ BO ₃ | 145,0 |
| FeSO ₄ ·H ₂ O | 125,0 |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 59,0 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 5,0 |
| MnCl ₂ ·4H ₂ O | 4,3 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 108,0 |
| Na ₂ MoO ₄ ·7H ₂ O | 125,0 |

Para la preparación de la solución de elementos traza, los ingredientes se disolvieron en agua destilada y se ajustó el pH a 5,0. A continuación se añadió EDTA 1 g/l y finalmente y se esterilizaron mediante filtración. Todos los reactivos utilizados son de Panreac.

Los cultivos de bacterias que nodulan leguminosas llevados a cabo en estos medios se incubaron a 28 °C durante 3-5 días o durante una semana en el caso del medio mínimo. Los medios líquidos se mantuvieron en agitación a 180 r.p.m.

Las cepas de *E. coli* utilizadas en este estudio se cultivaron en medio LB (Luria-Bertani) cuya composición es la siguiente:

| Composición LB | g/l |
|------------------------------|------|
| Triptona peptona (Difco) | 10,0 |
| Extracto de levadura (Difco) | 5,0 |
| NaCl (Panreac) | 10,0 |

El medio sólido VRB (Violet Red Agar, Scharlab), que posee lactosa como fuente de carbono fermentable y rojo neutro como indicador de pH, se utilizó para determinar la posible presencia de *E. coli* (que fermentan la lactosa, acidifican el medio y producen un viraje del indicador de pH a color rojo intenso, observándose como colonias de color rojo púrpura) cuando fue necesario confirmar la pureza de cultivos de *Rhizobium*, ya que éste es incapaz de crecer en VRB. Una vez seleccionados los transconjugantes de *Rhizobium* (negativos para crecimiento en VRB a las 48 h) se sembraron en su medio habitual suplementado con el antibiótico correspondiente.

| Composición Violet Red Agar | g/l |
|-----------------------------|-------|
| Extracto de levadura | 3,0 |
| Peptona | 7,0 |
| Sales biliares | 1,5 |
| Lactosa | 10,0 |
| Cloruro de sodio | 5,0 |
| Agar | 15,0 |
| Rojo neutro | 0,03 |
| Cristal violeta | 0,002 |

Los cultivos de *E. coli* se incubaron a 37 °C durante 18 horas, los medios líquidos se mantuvieron en agitación a 200 r.p.m.

1.2.2. Antibióticos empleados

Cuando fue necesario y según los plásmidos utilizados, estos medios se suplementaron con antibióticos a la concentración que se detalla a continuación. Las disoluciones de antibióticos concentradas (x100) empleadas se prepararon en agua desionizada y se esterilizaron por separado mediante filtración. En el caso de la preparación de tetraciclina, se empleó una mezcla etanol-agua al 50% para su disolución.

| Antibiótico | Concentración final (µg/ml) | | |
|--------------------------------|-----------------------------|--------------------|----------------|
| | <i>R. leguminosarum</i> | <i>S. meliloti</i> | <i>E. coli</i> |
| Sulfato de Kanamicina (km) | 50 | 200 | 50 |
| Tetraciclina (Tc) | 5 | 10 | 10 |
| Ampicilina (Ap) | - | - | 200 |
| Sulfato de Estreptomicina (Sm) | - | 200 | 100 |

1.2.3. Manipulación y conservación de las cepas

El crecimiento en medio líquido se determinó, midiendo la absorbancia de los cultivos por su densidad óptica a 600 nm. La viabilidad de los microorganismos se preservó mediante resiembras mensuales en medio sólido que se mantuvieron a 4 °C. Para todos los experimentos se partió de un precultivo en medio sólido realizado a partir de las cepas mantenidas a 4 °C que se incubó durante 3 días a 28 °C. El resto de manipulaciones se detallan en cada uno de los experimentos.

Para el mantenimiento de las cepas bacterianas de forma prolongada, todas las cepas empleadas en este trabajo se conservaron a -80 °C en criotubos que contenían glicerol (Panreac) estéril a una concentración final del 25%.

1.3. Plásmidos y vectores de clonaje

Para el clonaje de fragmentos se utilizaron vectores de alto número de copias que contienen un origen de replicación bacteriano y una multimeriana de restricción con sitios de reconocimiento para diferentes endonucleasas que se encuentran en el interior de la región codificante del péptido α del enzima β -galactosidasa de *E. coli* (*lacZ*). Así, permiten la selección de las colonias portadoras del plásmido recombinante en X-gal ya que no hidrolizan el sustrato cromogénico azul y pueden verse de color blanco.

El vector utilizado ha sido pGEM-T Easy (Promega) que procede del vector pGEM-5Zf digerido con *EcoRV*. Tiene una desoxitimidina 3' terminal en ambos extremos, característica que mejora la eficiencia de clonación de productos de PCR. Posee como marcador el gen de resistencia a ampicilina (Ap^r) (Figura 17).

Los plásmidos que se han utilizado para la clonación de fragmentos de ADN y obtención de los mutantes presentados en este trabajo se describen a continuación. Se adjuntan las características principales y los mapas a escala donde se señalan las zonas y sitios de restricción más relevantes a los que se hace mención a lo largo de este trabajo:

- El plásmido pK18*mobsacB* permite la selección de los transformantes (simples recombinantes) porque confiere resistencia a kanamicina y posee el gen *sacB* que confiere sensibilidad a sacarosa en bacterias Gram-negativas (Schafer *et al.*, 1994) (Figura 18). En este trabajo se ha utilizado para la movilización y selección de eventos de doble recombinación ya que es un plásmido suicida. Fue facilitado por el Dr. Juan San Juan de la Estación Experimental del Zaidín (Granada).

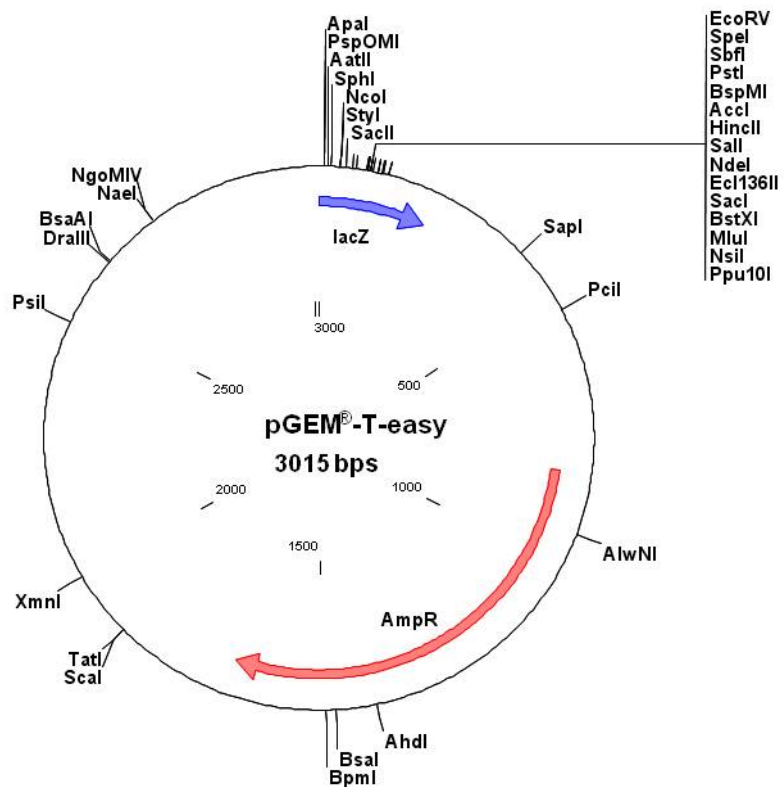


Figura 17. Vector pGEM[®]-T-Easy. Pueden observarse los sitios de corte de las principales endonucleasas de restricción.

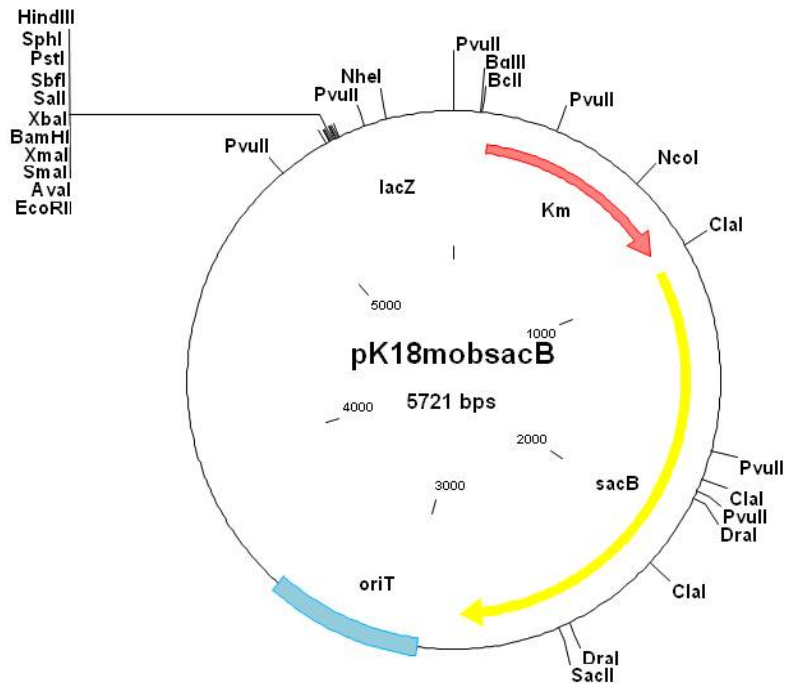


Figura 18. Vector pK18mobsacB. Pueden observarse los sitios de corte de las principales endonucleasas de restricción.

- El plásmido pBBR1MCS-2, de amplio rango de hospedador, fue construido a partir del pBBR1MCS al que se le insertó un gen que le confiere resistencia a kanamicina (Kovach *et al.*, 1995) (Figura 19). Ha demostrado ser un plásmido estable *in vitro* e *in vivo* en *Rhizobium* (Kovach *et al.*, 1994). Fue facilitado por el Dr. José Ignacio Jiménez-Zurdo, de la Estación Experimental del Zaidín (Granada).

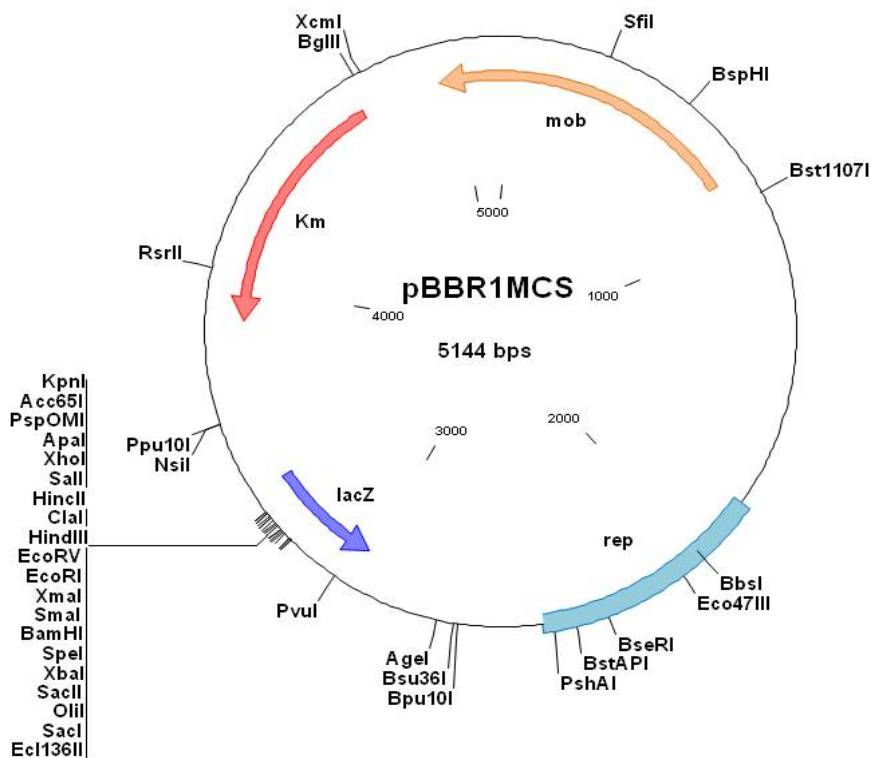


Figura 19. Vector pBBR1MCS-2. Pueden observarse los sitios de corte de las principales endonucleasas de restricción.

El resto de plásmidos utilizados en este trabajo, junto con las principales construcciones derivadas y sus características más relevantes, se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 11. Plásmidos utilizados en este trabajo

| Plásmido | Características relevantes | Referencia |
|----------|--|---------------------------------|
| pHC60 | Vector estable en la rizosfera que expresa constitutivamente una <i>gfp</i> ; Tc ^r | (Cheng y Walker, 1998) |
| pGUS3 | Derivado de pBI101 (Clontech) conteniendo la fusión transcripcional <i>nfe::gusA</i> , km ^r | (García-Rodríguez y Toro, 2000) |
| pRK2013 | Plásmido movilizador con el replicón ColE1 y los genes <i>tra</i> y <i>mob</i> . km ^r | (Figurski y Helinski, 1979) |
| pPMC2 | Fragmento de <i>celC2</i> amplificado con CelCexF y C2R clonado en pGEM-T Easy; Ap ^r | Este trabajo |
| pPMΔC2 | pPMC2 interrumpido con <i>BamHI</i> y <i>HindIII</i> ; Ap ^r | Este trabajo |
| pL209ΔC2 | Derivado de pK18 <i>mobsacB</i> . Contiene el fragmento extraído de pPMΔC2 cortado con PvuII ; Ap ^r | Este trabajo |
| pJZC2 | <i>celC2</i> insertado entre los sitios <i>XhoI</i> y <i>Sall</i> de pBBR1MCS-2; km ^r | Este trabajo |

1.4. Métodos de transformación en bacterias

1.4.1. Transformación de *E. coli*

1.4.1.1 Preparación de células competentes de *E. coli*

Las transformaciones de *E. coli* se realizaron utilizando células competentes obtenidas según el método descrito anteriormente (Hanahan *et al.*, 1991). Se realizó un preinóculo con una colonia de la cepa DH5α de *E. coli* en 5 ml de LB. Se incubó en agitación una noche a 37 °C. Dicho cultivo se utilizó para inocular un cultivo de 500 ml de medio φ ajustado a pH 7,6 con KOH 10N (Panreac). El inóculo se incubó a 37 °C con agitación vigorosa (250-300 r.p.m.) hasta que alcanzó una D.O._{550nm} de 0,48. Las bacterias se recogieron por centrifugación a 2500 r.p.m. durante 5 min a 4 °C.

| Composición Medio ϕ | g/l |
|-----------------------------|------|
| Triptona peptona (DIFCO) | 20,0 |
| Extracto de levadura (BD) | 5,0 |
| KCl (Panreac) | 0,75 |
| MgSO ₄ (Panreac) | 4,0 |

A continuación las células se resuspendieron en 150 ml del tampón TFB1 y se mantuvieron en hielo y con una agitación manual suave hasta su completa resuspensión. Después se incubaron en hielo durante 5 min, y fueron centrifugadas a 2.000 r.p.m. durante 15 min a 4 °C. Posteriormente se resuspendieron en un volumen de 20 ml de tampón TFB2 y se incubaron en hielo durante 15 min. Finalmente se distribuyeron en alícuotas de 100 μ l que se almacenaron a -80 °C.

| Composición tampón | TFB1 | TFB2 |
|--|------------|-----------|
| RbCl ₂ (Panreac) | 12,092 g/l | 1,209 g/l |
| MnCl ₂ .4H ₂ O (Panreac) | 9,90 g/l | - |
| Acetato potásico | 2,94 g/l | - |
| CaCl ₂ | 1,47 g/l | 11,02 g/l |
| Glicerol | 15% v/v | 15% v/v |
| MOPS | - | 2,093 g/l |

Ambos tampones fueron esterilizados por filtración y se mantuvieron en frío hasta el momento de su utilización. El pH del tampón TFB1 fue ajustado a 5,8 con ácido acético 0,2M y el tampón TFB2 fue ajustado a pH 7,0 con NaOH.

.1.4.1.2 Transformación mediante choque térmico

Para realizar las transformaciones se utilizaron alícuotas de 100 μ l de células competentes obtenidas por el procedimiento explicado anteriormente. Las células fueron descongeladas en hielo y a continuación se añadieron entre 10-200 ng de ADN plasmídico en un volumen de 40 μ l de H₂O. La mezcla fue mantenida en hielo durante 20 min tras los cuáles se sometieron a un choque térmico de 2 min a 42 °C y otros 2 min en hielo. Se añadieron 800 μ l de medio LB y se incubaron a 50 r.p.m. a 37 °C durante 45 min.

Transcurrido este tiempo, las células se inocularon sobre medio LB sólido con los correspondientes marcadores. Por un lado, para seleccionar los clones portadores de plásmidos recombinantes derivados de vectores de clonación que portan del gen *lacZ* de *E. coli*, se extendió a cada placa de Petri el sustrato cromogénico X-Gal [40 µl de una solución al 2% en n, n-dimetilformamida (p/v)] antes de añadir la mezcla de transformación. Por otro lado, se añadió al medio el antibiótico marcador de resistencia correspondiente.

Las placas se incubaron una noche a 37 °C. Para diferenciar mejor las colonias azules de las blancas, las placas se dejaron a 4 °C durante 1-2 h. Posteriormente se seleccionaron las colonias blancas, ya que son las que tienen interrumpido el gen *lacZ* por la inserción y por lo tanto no hidrolizan la X-Gal, no liberando el cromóforo azul. Estas colonias seleccionadas se inocularon en 3 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente y se comprobó la presencia del plásmido introducido mediante extracción del ADN plasmídico, digestión con los correspondientes enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa o por PCR en colonias.

1.4.2. Transformación de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

1.4.2.1 Transferencia de ADN mediante conjugación bi-triparental

La transferencia de los plásmidos utilizados durante este estudio a cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* se realizó mediante una conjugación biparental en medio sólido empleando la cepa S17.1 de *E. coli* como donadora o triparental empleando la cepa DH5α como donadora y como cepa “helper” o movilizadora la cepa DH5α con el plásmido pRK2013. Este plásmido contiene los genes necesarios para su transferencia por conjugación.

Para llevar a cabo la conjugación se tomaron cultivos de 24 h de las cepas crecidas en medios sólidos con sus respectivos antibióticos (*Rhizobium* en TY y *E. coli* pRK2013 en LB con km⁵⁰). Con ayuda de un asa de siembra estéril, se mezclaron en una proporción 2:1:1 en una placa de medio TY en el siguiente orden: cepa receptora (*Rhizobium*), cepa movilizadora (*E. coli* DH5α con pRK2013) en caso de ser necesaria y, por último, la cepa donadora de *E. coli* con el plásmido a transferir. Esta mezcla se incubó a 28 °C durante toda la noche y al día siguiente se sembró por agotamiento en estría en Medio Mínimo sólido para *Rhizobium* (O’Gara y Shanmugam, 1976) modificado y suplementado con el antibiótico selectivo correspondiente para la selección de los transconjugantes, en función de la resistencia intrínseca del plásmido.

Las placas se incubaron de nuevo a 28 °C y cuando en el medio aparecieron colonias aisladas (aproximadamente a los 5-7 días) con morfología típica de *Rhizobium*, se seleccionaron y se sembraron simultáneamente de nuevo en medio mínimo sólido suplementado con el antibiótico correspondiente y en medio sólido VRB (Violet Red Agar, Scharlab) que se incubó a 37 °C. Este medio de cultivo sirve para determinar la posible presencia de coliformes y confirmar la pureza de los transconjugantes seleccionados, ya que *Rhizobium* es incapaz de

crecer en él. Una vez seleccionados los transconjugantes de *Rhizobium* (negativos para crecimiento en VRB a las 48 h) se siembran en su medio habitual suplementado con el antibiótico correspondiente.

.1.4.2.2 Selección de intercambio alélico y cointegración

La obtención de mutantes knock-out de la cepa de estudio se llevó a cabo por doble recombinación según el método descrito para bacterias gram negativas (Schafer *et al.*, 1994). Para ello se llevó a cabo la delección de un fragmento interno del gen que se deseaba mutar (*celC*), previamente clonado en el plásmido pGEM[®]-T-Easy, mediante un doble corte con los enzimas *BamHI* y *HindIII*. Posteriormente, el fragmento con el gen interrumpido se subclonó en el plásmido suicida pK18*mobSacB*, con el que se transformó la cepa de estudio por conjugación triparental. Los transformantes que, por una recombinación simple (cointegración), habían integrado el plásmido en el cromosoma se seleccionaron en TY suplementado con kanamicina (50 µg/ml).

Para la selección de los dobles recombinantes se inoculó un matraz con 30 ml de TY con una colonia aislada de una de las placas anteriores y se mantuvo durante 3 días a 28 °C y 180 r.p.m. Posteriormente se extendieron 200 µl de este cultivo en TY con sacarosa al 10% (Panreac). Las colonias que crecieron en este medio, pero no en TY suplementado con kanamicina (50 µg/ml), eran las cepas recombinantes esperadas, ya que se confirma la pérdida de secuencias del vector. La pérdida de la copia original del gen en las colonias seleccionadas fue posteriormente confirmada por PCR y distintos ensayos de actividad enzimática.

2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

2.1. Aislamiento de ácidos nucleicos

En este apartado se describe la obtención de las muestras de ADN y ARN utilizadas como base de diferentes ensayos.

2.1.1. Extracción de ADN plasmídico

Dependiendo de las necesidades de cada ensayo, se utilizó uno u otro protocolo. En líneas generales, el aislamiento mediante kit comercial se restringió a la preparación de plásmidos para secuenciación y métodos que requieren un alto grado de pureza del ADN plasmídico. El procedimiento de lisis seguida de precipitación con sales de magnesio funciona muy bien en células de *E. coli*, y es válido para la digestión y posterior comprobación de las construcciones obtenidas. Por otro lado, el procedimiento rutinario para la extracción plasmídica en *R. leguminosarum* y *S. meliloti* fue la lisis alcalina.

.2.1.1.1 Aislamiento de ADN plasmídico mediante kit comercial

Durante la ejecución de los ensayos que se describen en esta memoria, se ha utilizado principalmente el kit de minicolumnas comerciales “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche), con las que se obtienen unos 15 µg de ADN plasmídico purificado siguiendo las instrucciones del fabricante como se detalla a continuación:

Las cepas bacterianas de *E. coli* transformadas con los plásmidos correspondientes fueron inoculadas a partir de una colonia en 3 ml de medio LB más el antibiótico adecuado, e incubadas a 37 °C durante 12 h en agitación a 200 r.p.m. Las células se recogieron por centrifugación a 13000 r.p.m. durante 3 min en tubos Eppendorf® y se eliminó el medio de cultivo.

A continuación, las células se resuspendieron en 250 µl de la Solución I (Tampón de suspensión: 50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA, pH 8,0; 2,5 mg/25 ml RNasa) y se mezclaron bien. Se añadió el mismo volumen de Solución II (Tampón de lisis: 0,2M NaOH; 1% SDS) se agitaron suavemente y se dejaron a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadieron 350 µl de la Solución III fría (Tampón de unión: 4M hidrocloreuro de guanidina; 0,5M acetato potásico, pH 4,2) se mezcló suavemente por inversión del tubo 3 a 6 veces y se incubó en hielo 5 min. La suspensión se recogió en tubos Eppendorf® y se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 10 min. El sobrenadante se introdujo en las columnas “minipreps” y se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 1 min descartando el filtrado. Se lavaron 2 veces los tubos con 700 µl del Tampón II (Tampón de lavado: 20 mM NaCl; 2 mM Tris-HCl, pH 7,5; etanol 40:10), se centrifugaron a 13000 r.p.m. durante 1 min y se descartó el filtrado. Se volvieron a centrifugar con las columnas secas para eliminar todos los restos. En este punto se cambiaron los tubos de recolección del filtrado por tubos Eppendorf® y se añadieron a cada uno 100 µl de agua miliQ estéril.

.2.1.1.2 Extracción de ADN plasmídico por precipitación con sales de magnesio

Esta técnica está basada en un método descrito anteriormente que permite el aislamiento rápido de plásmidos de *E. coli* (Studier, 1991). Se recogen los cultivos bacterianos, tal y como se describió en el apartado anterior, y se resuspenden en 100 µl de agua destilada estéril. La lisis tiene lugar por la adición de 100 µl de una solución compuesta por NaOH 0,1 M, EDTA 10 mM y 2% SDS. Se homogeneiza por agitación y se hierven durante 2 min. El ADN lineal, normalmente cromosómico, se precipita por la adición de 50 µl de MgCl₂ 1 M. Tras homogeneizar completamente hasta la aparición de precipitado blanco, se incuba en hielo de 2-5 min. Se centrifuga 1 min para sedimentar el precipitado en el fondo del tubo y añadimos 50 µl de acetato potásico 5 M para eliminar proteínas. El tubo invertido se mezcla con *vórtex* evitando que se levante el precipitado blanco del fondo y se incuba 5 min en hielo.

A continuación, se centrifuga durante 5 min y se recoge el sobrenadante en un tubo nuevo donde se precipitó el ADN plasmídico con 0,6 ml de etanol 100% frío. Los tubos se dejaron 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron 5 min a máxima velocidad. Se lavó el sedimento con 200 µl de etanol al 70% y se dejó secar a vacío. Por último, el ADN obtenido se resuspende en el volumen adecuado dependiendo de la concentración deseada o necesaria para las diferentes aplicaciones (lo más habitual para un plásmido de alto número de copias es resuspender en 25 µl de agua desionizada estéril, quedando una concentración aproximada de 10 µg/ml).

2.1.1.3 Aislamiento de plásmidos por lisis alcalina

Este método se realizó siguiendo el protocolo modificado por Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al.*, 1989). Se recogen 1,5 ml de cultivo bacteriano crecido hasta fase exponencial en TY y se sedimentan a 13000 r.p.m. durante 2 min. Se lavan las células con 500 µl de sarcosil 0,1% en TE y se vuelve a centrifugar, retirando el sobrenadante. Se resuspenden las células con 100 µl de lisozima 4 mg/ml disuelta en solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM; conservada a 4 °C). Se incuba 5 min a temperatura ambiente, tras los cuales se añaden 200 µl de solución II (NaOH 0,2 M, 1% SDS). Se homogeniza la preparación agitando el tubo por inversión varias veces y se mantiene en hielo durante 5 min.

A continuación se adicionan 150 µl de solución III (acetato potásico 5 M pH 4,8) que ayudará a la neutralización de la solución y la precipitación de proteínas. Se mezcla invirtiendo el tubo y se incuba en hielo 5 min para minimizar el posible daño con ADNAs celulares y se centrifuga a 13.000 r.p.m. durante 5 min para sedimentar los restos celulares, recogiendo el sobrenadante en un tubo nuevo.

Se añade un volumen (~400 µl) de una mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v), se mezcla vigorosamente y se centrifuga durante 5 min a 13.000 r.p.m. Se recoge la fase superior acuosa y se mezcla con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico para eliminar los posibles restos de fenol en las preparaciones. Se mezcla de nuevo y se centrifuga durante 5 min. La fase acuosa se pasa a un tubo nuevo y se precipita el ADN con 2,5 volúmenes de etanol 96% frío. Se deja la muestra 5 min a temperatura ambiente para evitar la precipitación del ADN genómico. Se centrifuga el ADN precipitado y se lava el sedimento con 200 µl de etanol al 70%. Se deja secar y se resuspende en 25 µl de agua desionizada estéril.

2.1.2. Extracción de ADN cromosómico total

Para extraer el ADN cromosómico de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii así como de los mutantes obtenidos en este estudio se siguió un protocolo puesto a punto en nuestro laboratorio (Rivas *et al.*, 2001) con algunas modificaciones.

Para ello se partió de un cultivo en placa de 48 h y de éste se realizó una siembra a partir de una colonia en 3 ml de medio TY que se incubó a 28 °C en agitación a 180 r.p.m. durante 24 h. Las células se recogieron por centrifugación a 13000 r.p.m. durante 3 min en tubos Eppendorf® y se eliminó el medio de cultivo. Posteriormente se añadieron 500 µl de agua destilada para resuspender las células que fueron centrifugadas durante 7 min a 10000 r.p.m. para lavarlas. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500 µl de sarcosil (Sigma) al 0,1% y se centrifugaron a 10000 r.p.m. durante 7 min para eliminar los polisacáridos, desechando de nuevo el sobrenadante.

Para lisar las células y extraer el ADN se les añadieron 100 µl de NaOH 0,05M, se mezclaron con el *vórtex* y se calentaron a 100 °C durante 4 min. Transcurrido este tiempo, se añadieron 200 µl de agua desionizada estéril, se homogeneizó la mezcla de forma suave y se centrifugó a 6000 r.p.m. durante 3 min para eliminar los restos celulares. El sobrenadante obtenido se trasvasó a un segundo tubo.

Con el objetivo de obtener una mayor pureza, se procedió a la fenolización del ADN obtenido. Para ello, se añadió un volumen igual de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v), se mezcló con el *vórtex* durante 10 s y se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 5 min a 4 °C. La fase acuosa superior se trasvasó a un tubo nuevo y se adicionó un volumen equivalente de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1, v/v), se homogeneizó nuevamente con el *vórtex* durante 10 s y se centrifugó durante 5 min a 13000 r.p.m. y 4 °C. Se trasvasó una vez más la fase acuosa a un nuevo tubo, se añadieron 0,07 volúmenes de acetato de sodio pH 7,0 (Panreac) y 4 volúmenes de etanol absoluto (Merck). Se agitó por inversión y se mantuvo a -20 °C durante 12 h para precipitar el ADN.

Por último, las muestras se centrifugaron a 13000 r.p.m. durante 20 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se secaron en SpeedVac® SPD1018 (Savant) durante 5 min. Finalmente se agregaron 100 µl de agua miliQ estéril a cada uno de los tubos y se calentaron a 42 °C durante 15 min para disolver del ADN y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

2.1.3. Extracción de ARN total

Este protocolo presenta algunas modificaciones sobre el descrito previamente (Cabanés *et al.*, 2000). Se lleva a cabo la inoculación de 0,5 ml del cultivo bacteriano saturado en un tubo de 50 ml que contiene 9,5 ml de medio con el correspondiente antibiótico. Se cultiva en agitación hasta el final de su fase exponencial, (D.O._{600nm} ~0,6) y se recoge en dos tubos de 1,5 ml mediante varias centrifugaciones de 1-2 min a 14000 r.p.m. Se resuspenden las células sedimentadas en cada tubo Eppendorf con 300 µl de solución de lisis compuesta por 1.4% SDS y 4 mM EDTA. Se incuba durante 10 min a 65°C, agitando de manera esporádica (cada 3 min).

Pasado este tiempo, los tubos se ponen en hielo y se adicionan 150 µl de NaCl 5M a 4°C, se mezclan vigorosamente y se mantienen en hielo durante 10 min. Se centrifuga durante 15 min a 4°C y 13000 r.p.m. Se pone el sobrenadante

en un tubo nuevo y se precipita con 1 ml de etanol 100% frío (en este punto se puede dejar varios días). Se centrifuga el ácido nucleico precipitado durante 30 min a 13000 r.p.m. y 4°C.

A continuación, se elimina muy bien todos los restos de etanol y se deja secar ligeramente a temperatura ambiente. Posteriormente, se resuspenden los precipitados correspondientes a los 10 ml de cultivo inicial en 85 µl de agua destilada y se mezclan ambos tubos para el tratamiento con ADNasa I. La digestión del ADN en nuestras preparaciones tiene lugar por la incubación durante una hora a 37°C de estos 85 µl con 50 U de ADNasa I libre de ARNasas (Roche) en presencia de 60 U de inhibidor de ARNasas (Roche) en el tampón adecuado (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM MgCl₂). Transcurrido este tiempo, se eliminan las proteínas mediante dos fenolizaciones sucesivas: en la primera se añade 1V (100 µl) de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v). Al trabajar con ARN se utiliza fenol a pH ácido porque este tipo de fenol arrastra con más facilidad al ADN, dejando en la fase acuosa el ARN (Sambrook *et al.*, 1989). Se toma la fase superior y se mezcla dos veces con 1V de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). En el primer caso se centrifuga durante 10 min y en el segundo es suficiente con 5 min a 4°C y máxima velocidad. La fase acuosa superior se precipita con 600 µl de etanol 100% y 75 mM acetato sódico 3 M pH 5,2 frío. Se mantiene al menos una hora a -80°C. Se centrifuga a 4°C durante 30 min y el precipitado se lava con 0,5 ml de etanol 70% frío. La muestra se deja secar a temperatura ambiente y se resuspende en 20 µl de agua destilada.

En ocasiones puntuales ha sido necesaria la extracción de ARN total mediante el uso de kit comerciales. En concreto, se han usado High Pure *RNA Isolation Kit* (Roche) siguiendo las indicaciones del proveedor.

2.1.4. Determinación de la concentración y pureza de ADN y ARN

El cálculo de la concentración y pureza de los ácidos nucleicos se estimó siguiendo el método espectrofotométrico descrito en Sambrook *et al.* (1989) utilizando un espectrofotómetro (*NanoDrop® ND-1000*) que integra todos estos datos con sólo poner 1-2 µl de nuestra muestra.

La relación $D.O_{.260nm} / D.O_{.280nm}$ se usó como estimador de la pureza de la preparación, considerándose valores por debajo de 1,8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol.

2.1.4.1 *Electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes*

Esta técnica se ha utilizado para visualizar la integridad del ARN total extraído. Consiste en la adición a un gel de agarosa al 1,4% de un agente desnaturalizante como es el formaldehído. Se prepara disolviendo por

calentamiento la agarosa (Roche) en agua destilada y cuando se disipa el calor se añade la mezcla de MOPS (MOPS 20 mM, acetato sódico 5 mM y EDTA 1 mM; ajustar a pH 7 con NaOH) y el formaldehído hasta concentración final 1X y 1,875% (v/v), respectivamente. Para mejorar la visualización del ARN, para no tener que sumergirlo en la solución de bromuro de etidio, éste se adiciona directamente en el tampón de carga 6X [glicerol 45% (v/v), azul de bromofenol 0,09% (p/v) y bromuro de etidio 0,25 mg/ml].

Se carga la muestra en el gel y se añade el tampón de electroforesis en la cubeta, que en este caso es MOPS 1X. El volumen final de muestra fueron ~10 µl conteniendo unos 15 µg de ARN. La electroforesis se llevó a cabo a 60 V hasta que el azul de bromofenol alcanzó el último tercio del gel. Terminada la electroforesis, se visualizaron los fragmentos de ARN al iluminar el gel con luz UV (260 ó 320 nm) utilizando el equipo Gel Doc 2000 (Bio-Rad).

2.2. Manipulación y amplificación de ADN

En todo los casos, los ácidos nucleicos una vez extraídos se mantuvieron secos o disueltos en agua miliQ estéril a -20 °C hasta su posterior uso mediante alguna de las técnicas que se detallan a continuación.

2.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR (“Polymerase Chain Reaction” o reacción en cadena de la polimerasa) permite amplificar fragmentos de ADN de forma cíclica generando un gran número de copias idénticas. Para ello, se utilizan como cebadores dos oligonucleótidos o “primers” correspondientes a los extremos 5’ de las dos cadenas del fragmento de ADN que se desea amplificar, cuyos extremos quedarán definidos por la secuencia de los dos cebadores empleados. Las muestras de ADN utilizadas como molde, junto con los oligonucleótidos correspondientes, se someten a una serie de ciclos de desnaturalización, anillamiento y extensión o copia realizada por una ADN polimerasa termoestable, resultando en la amplificación del ADN de interés.

En este trabajo, esta técnica fue empleada para la amplificación de secuencias de ADN cromosómico y plasmídico. Dependiendo de la finalidad se utilizaron distintas polimerasas de una baja tasa de errores en el producto final, y la reacción se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. La polimerasa más comúnmente utilizada fue la del kit “AmpliTaq Gold[®] with Gene Amp[®]” de Roche. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 25 (ó 50) µl cuya composición se detalla a continuación:

| Reactivo | μl/reacción |
|-----------------------------|-------------|
| Tampón de PCR 10x | 2,5 |
| dNTP 10 mM | 0,5 |
| MgCl 25 mM | 5,0 |
| <i>Primer R</i> 20 μM | 2,0 |
| <i>Primer F</i> 20 μM | 2,0 |
| BSA (Sigma) 0,1% (p/v) | 1,0 |
| Agua miliQ estéril | 9,3 |
| <i>Taq</i> Polimerasa 5U/μl | 0,2 |
| ADN (100 ng/μl) | 2,5 |

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador modelo Gene Amp[®] PCR System 9700 PE (Applied Biosystems, USA) utilizando los programas que se muestran a continuación:

| Etapa | | Temperatura (°C) | Tiempo (min:s) |
|----------------------|-------------------|-------------------|----------------|
| Predesnaturalización | | 95 | 10:00 |
| 35 ciclos | Desnaturalización | 95 | 0:30 |
| | Anillamiento | de 52 a 57 | 0:30 |
| | Elongación | 72 | 1:00/kb |
| Extensión final | | 72 | 15:00 |
| Conservación | | 4 | ∞ |

Dentro de los ciclos, las etapa de desnaturalización suele realizarse a 95°C 30 s aunque el tiempo depende del tipo de molde; al comienzo del programa de PCR suele incluirse un primer ciclo de desnaturalización para disponer de todo el ADN como cadena simple. La temperatura de anillamiento depende de la composición de los cebadores pero suele rondar los 55°C y el tiempo estándar es 30 s. La extensión no es más que la temperatura óptima para la actividad de la enzima; el tiempo de este ciclo suele estar en función del tamaño del amplificado y del tipo de enzima usado (por ejemplo, *Taq* polimerasa 1Kb/30 s). Además el programa de PCR suele terminarse con un ciclo prolongado de extensión de 5-10 min para completar los fragmentos.

Una vez concluida la PCR, las muestras se mantuvieron refrigeradas a 4 °C hasta que se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. La limpieza de este tipo de productos (eliminación de cebadores y sales) se realizó mediante columnas del *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen).

.2.2.1.1 PCR de colonia

Es una estrategia muy rápida para la comprobación de la presencia de determinados insertos a partir de las colonias en placa. Es más sucia que utilizar lisados de colonias pero de efectividad similar. Se trata de repartir los 25 µl de la mezcla de reactivos de PCR y, en lugar de poner el ADN o el lisado, picar directamente una colonia de la placa con palillo y agitar dentro de la mezcla.

2.2.2. Oligonucleótidos cebadores empleados

Los oligonucleótidos utilizados en este estudio fueron sintetizados por Isogen y Sigma. En las tablas a continuación se detallan las secuencias de los oligonucleótidos utilizados, en función de la técnica para la que se diseñaron:

- Amplificación y secuenciación del gen *celC*:

| | |
|----------------|----------------------------|
| CelCexF | 5' TCGCCGCCAACTGGCTGTC 3' |
| C1F | 5' ATCAGCCACAGCGAAGGGCA 3' |
| C2R* | 5' CACAGACACTCCGGATGC 3' |

* Los oligonucleótidos marcados con un asterisco fueron además utilizados para la amplificación de fragmentos intra- e intergénicos del operón *celABC* durante los ensayos de análisis de expresión.

- Amplificación del gen ribosómico 16S: para amplificar el gen ribosómico 16S se utilizaron los primers 8F y 1522R (Rivas *et al.*, 2002) diseñados a partir del consenso de las secuencias de ADN ribosómico 16S de diferentes microorganismos:

| | |
|--------------|----------------------------|
| 8F | 5' AGAGTTTGATCTGGCTCAG 3' |
| 1522R | 5' AAGGAGGTGATCCANCCRCA 3' |

-Para secuenciar los fragmentos de este gen se emplearon los siguientes cebadores (Rivas *et al.*, 2001):

| | |
|-----------|----------------------------|
| X1 | 5' GGCTCAGRAYGAACGCTG 3' |
| X2 | 5' CTCCTACGGGAGGCAGCA 3' |
| X3 | 5' CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT 3' |
| X4 | 5' CGTGCCAGCAGCCGCGGT 3' |
| X5 | 5' CAAAGGAATGACGGGGGC 3' |
| X6 | 5' GAGGAAGGTGGGGATGCCGT 3' |

- La amplificación de los genes *recA* y *atpD* se llevó a cabo con los cebadores *recA*-Rh-4R y *recA*-Rh-1F, y *atpD*-Rh-3R y *atpD*-Rh-1F, respectivamente, diseñados a partir de regiones conservadas en las secuencias disponibles de estos genes en las bases de datos (Gaunt *et al.*, 2001):

| | |
|-------------------|----------------------------------|
| RecA-Rh-1F | 5'CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA 3' |
| RecA-Rh-4R | 5' CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT 3' |
| AtpD-Rh-1F | 5' SCTGGGSCGYATCMTGAACGT 3' |
| AtpD-Rh-3R | 5' GCCGACACTTCCGAACCNGCCTG 3' |

El gen *nodC* se amplificó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos *nodCF* y *nodCI*, diseñados a partir de zonas conservadas de las secuencias de *nodC* de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *R. tropici*, *R. etli* bv. *phaseoli*, *R. galegae*, *S. meliloti*, *S. fredii*, *Sinorhizobium* sp. NGR234, *M. loti*, *B. japonicum* y *B. elkanii* disponibles en las bases de datos (Laguerre *et al.*, 2001).

| | |
|--------------|----------------------------|
| nodCF | 5' AYGTHGTYGAYGACGGTTC 3' |
| nodCI | 5'CGYGACAGCCANTCKCTATTG 3' |

La preparación del cóctel de reacción de PCR para amplificar los genes *recA*, *atpD* y *nodC*, se llevó a cabo según lo indicado anteriormente. Para la secuenciación se utilizaron los mismos primers que para realizar la amplificación.

- La amplificación y secuenciación de los genes *celA* y *celB* se llevó a cabo con los cebadores que se detallan a continuación, que fueron diseñados a partir de regiones conservadas en las secuencias disponibles de estos genes en las bases de datos.

| | |
|-----------------|-------------------------------|
| OcelF1* | 5' CCGGAGATAGAGCATGATGCC 3' |
| OcelF2 | 5' CGATCTTCCTGTTTGCGCCGC 3' |
| OcelF3 | 5' TCTCAACAACCGCCCGATCG 3' |
| CelCS2F | 5' AGCCGCTGATCGCCGGCC 3' |
| OcelF3b | 5' TGAGCAGCATGCCGAACCA 3' |
| OcelR1 | 5' GGTCGTTCCGCTGGCCCTGG 3' |
| OcelR2 | 5' CGCCACCGCACCGATTGCA 3' |
| OcelR3* | 5' CGCCGCCAACTGGCTGTCTGA 3' |
| CelCS1R | 5' CCTGCAGACCCAGCTCATC 3' |
| CelCS2R | 5' CATCATCCAGCGCGGCCT 3' |
| OcelR4 | 5' GGTCATGGTCGGTCTATCTG 3' |
| OcelF7 | 5' GAATACGGCTCCGGTTCAGCG 3' |
| S1R | 5' GATGAGCTGGGTCTGCAGG 3' |
| S2R | 5' AGGCCGCGCTGGATGATG 3' |
| R1 | 5' CCAGGGCCAGCGGAACGACC 3' |
| R4 | 5' CAGATAGACCGACCATGACC 3' |
| R2 | 5' TGCAATCGGTGCGGTGGCG 3' |
| R3 | 5' TCGACAGCCAGTTGGCGGCG 3' |
| celB1R* | 5' GCCGCTCGCCGGACATGTCG 3' |
| celC3F* | 5' GGC GTGGA ACTGTTGAAGACG 3' |
| ocelB1F* | 5' CGGTGACGGATGCGCAGACG 3' |
| ocelB2F* | 5' GCAAGACCGCAAGATCGAG 3' |
| icela* | 5' GTTGGTGGTGCGCCAGTAGACA 3' |
| icelC* | 5' ATACCAGATCTGCTCGAAATCGGC3' |
| ocelF5* | 5' GCGGCTGGAACCTCATCTACCT 3' |
| ocelR5 | 5' CGCGTCACGATCTCCGATCGTA 3' |
| ocelF7 | 5' GAATACGGCTCCGGTTCACG 3' |

* Los oligonucleótidos marcados con un asterisco fueron además utilizados para la amplificación de fragmentos intra- e intergénicos del operón *celABC* durante los ensayos de análisis de expresión.

2.2.3. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Los tratamientos de ADN, tanto genómico como plasmídico, con endonucleasas de restricción se realizaron como paso previo a la hibridación por “Southern Blot” o para la caracterización física de los plásmidos y fragmentos de ADN previa a la construcción de plásmidos recombinantes.

Las digestiones con endonucleasas de restricción se realizaron en función de las instrucciones de temperatura óptima y tampón de restricción requeridos para cada enzima y suministradas por los proveedores (Roche y New England Biolabs). Las reacciones de digestión se llevaron a cabo en un volumen total de 25 µl, cuya composición fue la siguiente:

| Reactivo | Concentración final |
|-----------------------------|---------------------|
| ADN | 1 µg |
| Tampón de restricción (10X) | 2,5 µl |
| Agua miliQ estéril | Hasta 25 µl* |
| Enzima de restricción | 1 unidad |

*La cantidad de agua se ajustó en función de la concentración del ADN y del enzima.

Las digestiones se llevaron a cabo durante 1 h para el ADN plasmídico ó 12 h en el caso del genómico a 37 °C.

Cuando el ADN hubo de ser tratado con varias endonucleasas de restricción de forma sucesiva debido a que los tampones necesarios para cada una eran incompatibles, se realizó una digestión secuencial. Primero se digirió con el enzima que requería menor fuerza iónica y se comprobó que el plásmido se había linearizado en un gel de agarosa. El producto de la reacción se precipitó y se resuspendió y tamponó para llevar a cabo la otra reacción con el siguiente enzima.

La eficacia de la reacción de restricción se comprobó visualizando los fragmentos digeridos en geles de agarosa utilizando marcadores de tamaño conocidos para comprobar su longitud.

2.2.4. Tratamiento de extremos

Cuando fue necesario, los extremos no compatibles se trataron, para generar extremos romos, con la ADN polimerasa Klenow (Roche) en presencia de

dNTPs. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μl cuya composición fue la siguiente:

| Reactivo | Concentración final |
|--------------------------|---------------------|
| Producto de la digestión | 5 μl |
| Tampón Klenow (10X) | 2 μl |
| Agua miliQ estéril | 2 μl |
| dNTPs 2 mM | 10 μl |
| Klenow polimerasa | 1 μl |

La composición del tampón es 500 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM MgCl_2 ; 1mM DTT. Se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. La inactivación del enzima se lleva a cabo incubando la mezcla en un baño a 75 °C durante 10 min.

2.2.5. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación

La ligación de moléculas de ADN se llevó a cabo con la ADN ligasa del fago T4 de Roche siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando el correspondiente tampón 10X (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 5 mM DTT; 60 mM KCl; 50% glicerol [v/v]). Las reacciones se llevaron a cabo generalmente en un volumen de 5-10 μl y se incubaron a 16 °C durante toda la noche.

2.2.6. Electroforesis de fragmentos de ADN en geles de agarosa

Los productos de PCR y de las digestiones de plásmidos fueron sometidos a electroforesis en geles horizontales de agarosa (Cambrex Bio Science), de diferente tamaño en función de la cubeta de Bio-Rad utilizada. La concentración de agarosa en los geles varió entre 0,6% y 2% (p/v) en función del tamaño de los fragmentos de ADN que se querían analizar.

El tampón utilizado para la preparación de los geles, así como para la electroforesis fue TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0, Millipore). Las muestras de ADN se mezclaron con tampón de carga de electroforesis (azul de bromofenol 0,25% (Merck) y sacarosa 40% (p/v) (Panreac) en proporción 3:1 (v/v) para monitorizar el estado de la electroforesis por la posición relativa del indicador del frente. A continuación se aplicó un voltaje variable (entre 1 y 7,5 voltios/cm) dependiendo de la cantidad de ADN y del rango de tamaño de las bandas que se pretendieran ver (para detectar el fragmento correspondiente al gen

celC se aplicó un voltaje de 80V durante 80 min) con una fuente de alimentación de Bio-Rad.

Terminada la electroforesis, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 20 min para permitir visualizar los fragmentos de ADN al iluminar el gel con luz UV (260 ó 320 nm) utilizando el equipo Gel Doc 2000 (Bio-Rad) tras lavar el gel con agua.

2.2.6.1 Marcadores de peso molecular

La determinación del tamaño molecular de los fragmentos de restricción y los productos de PCR se llevó a cabo mediante la inclusión en los geles de al menos dos carriles conteniendo fragmentos patrón de ADN de tamaños conocidos. En función de los tamaños esperados, se utilizaron los patrones III, VI o XIV (Figura 20) de Roche en proporción 1:1 (v/v) junto con el tampón de carga.

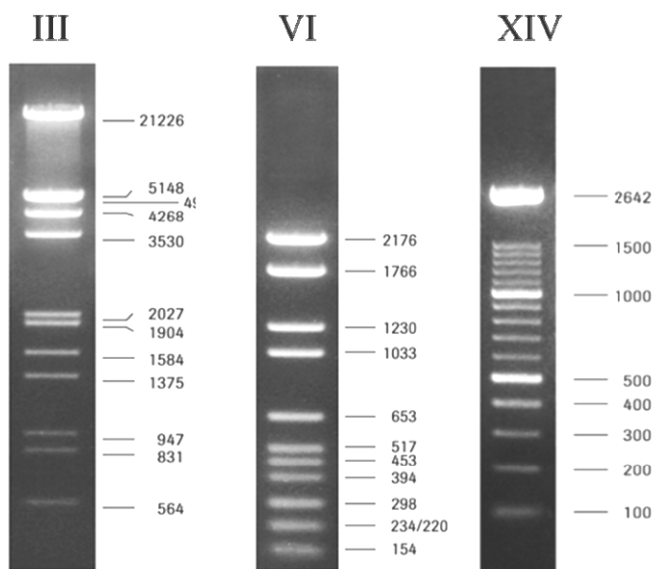


Figura 20. Tamaños esperados de los fragmentos de ADN de los distintos marcadores de peso molecular empleados en este trabajo.

2.2.7. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN de interés se cortaron del gel y se purificaron utilizando las microcolumnas de extracción del DNA Gel Extraction Kit (Millipore). Se centrifugaron a 7200 r.p.m. durante 13 min. El filtrado fue trasvasado a un tubo Eppendorf® y se le añadieron 0,07 volúmenes de acetato de sodio pH 7,0 y 4 volúmenes de etanol absoluto manteniéndolos a -20 °C durante 12 h.

Las muestras se centrifugaron a 12000 r.p.m. durante 20 min, se eliminó el sobrenadante y se secaron en SpeedVac[®] durante 10 min. Se agregó el volumen de agua miliQ estéril necesario, según su uso posterior, a los tubos y se calentaron a 42 °C durante 15 min para disolver el ADN.

2.2.8. Secuenciación de ADN

Las reacciones para secuenciación se prepararon utilizando 5,5 µl de la solución de ADN (aproximadamente 100 ng de ADN) purificada como se ha descrito anteriormente y 2,5 µl del *primer* correspondiente a una concentración 2 µM.

La secuenciación fue realizada por el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca utilizando el sistema ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer de Applied Biosystems (USA).

2.3. Técnicas de hibridación de ADN-ADN (“Southern Blot”)

2.3.1. Marcaje no radiactivo de sondas de ADN

Las sondas fueron marcadas para su visualización mediante quimioluminiscencia mediante la incorporación de digoxigenina dentro del nuevo ADN sintetizado.

Para ello se llevó a cabo una reacción de PCR en la que se sustituyeron los dNTPs por dUTP marcados con digoxigenina (Roche), usando como ADN molde un plásmido o un fragmento de ADN que contuviese la zona que se deseaba marcar. El producto obtenido es de mayor peso molecular que el mismo fragmento sin marcar, por lo que el resultado pudo comprobarse mediante electroforesis en gel de agarosa. Las sondas fueron almacenadas a -20 °C hasta su utilización.

2.3.2. Hibridación de ADN

La técnica utilizada fue desarrollada por Southern en 1975. Se ha seguido el protocolo descrito por Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al.*, 1989), con algunas modificaciones.

2.3.2.1 Digestión del ADN con enzimas de restricción

El ADN cromosómico de la cepa de estudio fue digerido con los enzimas de restricción correspondientes y el producto obtenido se sometió a electroforesis

en un gel horizontal de agarosa durante toda la noche a 15V. Tras la electroforesis, el gel se fotografió y se iluminó con luz UV (260nm) durante 10 min, con el fin de crear roturas en las cadenas de los ácidos nucleicos y favorecer así la transferencia de los fragmentos de ADN de mayor tamaño a la membrana.

.2.3.2.2 Transferencia a membranas de nylon

El gel se colocó sobre una membrana de nylon (Pall Byodine[®] Transfer Membrane) previamente hidratada con SSC 20X (NaCl 3 M; citrato sódico 0,3M pH 7,0) a la que se transfirió el ADN mediante una bomba de vacío (VacuGene XL, Pharmacia[®]) durante 1 h aplicando una presión de 50 mbar y utilizando NaOH 1M como solución de transferencia.

A continuación, la membrana se colocó en solución 2X SSC para eliminar los restos de agarosa y se secó entre dos piezas de papel Whatman[®] 3MM para proceder a la fijación irreversible del ADN a la membrana mediante calentamiento a 100 °C durante 30 h en un desecador termostático de vacío (Vacuo-temp, Selecta[®]). Las membranas se guardaron a temperatura ambiente hasta su utilización.

.2.3.2.3 Prehibridación e hibridación

La prehibridación y posterior hibridación de las membranas a las cuáles se transfirieron los ácidos nucleicos se llevaron a cabo en tubos de vidrio perfectamente cerrados, con agitación moderada y constante, utilizando volúmenes de hibridación mínimos pero suficientes para mantener las membranas siempre húmedas.

Tanto la prehibridación como la hibridación de ADN fueron llevadas a cabo en agitación en un horno de hibridación a 42 °C utilizando un tampón cuya composición es formamida al 50%, SSC 5X, n-laurilsarcosina 0,1% (p/v), SDS 0,02% (p/v) y reactivo bloqueante 2% (p/v) (“Blocking Reagent”, Roche). La prehibridación se mantuvo durante al menos 2 h, seguidamente se añadió la sonda previamente desnaturalizada (10 min a 100 °C) y se dejó durante toda la noche en incubación en las condiciones mencionadas.

.2.3.2.4 Lavado de la membrana

El lavado de la membrana para eliminar los restos de la sonda consistió en 2 incubaciones de 5 min a temperatura ambiente con solución de lavado 2X [SSC 2X, SDS 0,1% (p/v)] y 2 incubaciones de 15 min a 68 °C con solución de lavado 0,1X [SSC 0,1X, SDS 0,1% (p/v)].

.2.3.2.5 Detección y revelado

La detección se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante, como se describe a continuación. Las soluciones empleadas en la detección se diluyeron en tampón 1 (ácido málico 0,1M, NaCl 0,15M pH 7,5). Las membranas

se equilibraron en tampón de lavado [tampón 1 con Tween 20 0,3% (v/v)] durante 5 min y posteriormente se bloquearon en tampón 2 [reactivo bloqueante 1% (Roche) disuelto en tampón 1] durante 30 min.

Pasado este tiempo las membranas se incubaron en la solución que contiene el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con el enzima fosfatasa alcalina (*Anti Digoxigenin AP*, Roche), dilución 1:20.000 en tampón 2, durante 30 min y se lavaron 2 veces con tampón de lavado durante 15 min para eliminar el anticuerpo que no se hubiera unido a la sonda.

Las membranas se equilibraron en tampón 3 (Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,1M pH 9,5) durante 5 min y posteriormente con una disolución 1:100 de CSPD (Roche) en tampón 3, un sustrato muy sensible para la fosfatasa alcalina y cuya reacción genera rápidamente una señal luminosa. A continuación las membranas se retiraron del tubo de hibridación, se dejaron secar a temperatura ambiente sobre papel Whatman® durante 5 min. Seguidamente se retiró el exceso de líquido de las membranas, se envolvieron en plástico y se expusieron a una película autorradiográfica (Kodak) durante al menos 5 min para el revelado de las bandas.

2.4. RT-PCR

La síntesis de ADNc desde muestras de ARN total tratadas con ADNasa se realizó en dos pasos como se describe a continuación. En primer lugar, para la desnaturalización, se mezclaron de 50 pg a 5 µg de ARN total con una solución conteniendo 100 ng/µl de una mezcla de oligonucleótidos (Random Primers, Invitrogen), 1 µl de una mezcla 10 mM de dNTP y se completó el volumen hasta 12 µl con agua destilada estéril.

A continuación, se incubó la muestra durante 5 min a 65°C e inmediatamente se enfrió en hielo. Se añadieron los siguientes reactivos:

| | |
|---|------|
| Tampón de Síntesis 5X (First-strand, Invitrogen) | 5 µl |
| 0,1 M DTT, 1µl de inhibidor de ARNasa (40U/µl, RNase OUT, Invitrogen) | 1 µl |
| Inhibidor de ARNasa (40U/µl, RNase OUT, Invitrogen) | 1 µl |
| Agua DEPC | 1 µl |
| Reversotranscriptasa (15 U/µl Thermoscript RT, invitrogen) | 1 µl |

La mezcla se incubó a 25°C durante 10 min para la unión de los cebadores y, posteriormente durante 50 min a 50°C para la síntesis de ADNc. El último ciclo consistió en una incubación de 5 min a 85°C. Finalmente, para inactivar el enzima y parar la reacción, se añadió 1 µl de RNase H (Invitrogen). Finalmente la mezcla se sometió a 37°C durante 20 min.

Una vez tenemos el ADNc se procede con la amplificación por PCR. Se diluyen 1/30 las muestras de ADNc y se usa 1 µl como molde para la PCR. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl en presencia de dNTPs 1 mM, 15 pmol de cada uno de los cebadores y 2 U de *Taq* polimerasa. El programa de PCR se ajusta al estándar con una temperatura de anillamiento que depende de la pareja de oligonucleótidos utilizada y 35 ciclos de amplificación. Además de las reacciones necesarias, se incluyó una como control negativo utilizando como molde una muestra de ARN y un control positivo con una muestra de ADN.

Finalmente los fragmentos obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa.

3. TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.1. Obtención de extractos celulares

A partir de cultivos de las cepas de estudio crecidos durante 3- 5 días a 28 °C en medio YMA sólido, se realizó un preinóculo y posteriormente se inocularon matraces con 30 ml de medio YMB. Los matraces fueron incubados a 28 °C en agitación a 180 r.p.m. durante 72h, de forma que los cultivos fueron interrumpidos al inicio de la fase estacionaria de crecimiento, cuando la población bacteriana fue de 10⁹ células/ml aproximadamente.

Al cabo de ese tiempo se centrifugaron a 12.000 r.p.m. durante 10 min a 4 °C (con la centrífuga Beckman Avanti J-251 High Performance Centrifuge). El precipitado se lavó una vez con 20 ml de agua y se resuspendió en 500 µl de agua destilada. Finalmente la suspensión celular se pasó a un tubo Eppendorf® y se guardó hasta su uso a -20 °C.

Una vez descongeladas las muestras celulares, se obtuvieron los extractos celulares mediante sonicación durante 5 ciclos de 10 s a 55W con intervalos de reposo de 5 s entre cada ciclo, manteniendo constantemente en hielo la suspensión de bacterias. A continuación, los extractos obtenidos fueron centrifugados a 12.000 r.p.m. y a 4 °C (Centrífuga Eppendorf®) durante 12 min. Se desecharon los restos celulares y se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo. A continuación, se determinó la concentración de proteínas en los extractos como se describe a continuación para normalizar las muestras. Inmediatamente se realizaron los ensayos de actividad en placa y el zimograma de las soluciones enzimáticas obtenidas. El resto de muestra se conservó a -20° C.

3.2. Determinación del contenido en proteínas

La concentración del contenido en proteína presente en las diferentes muestras se determinó según el método descrito por Bradford (Bradford, 1976). El volumen de muestra conteniendo proteína se completó con agua miliQ hasta un

volumen final de 800 μ l. A continuación, se añadieron 200 μ l de reactivo de Bradford de BioRad Protein Assay (BioRad[®] laboratorios) e inmediatamente se agitó mediante *vórtex* y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente se midieron los valores de absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm, utilizando como blanco una mezcla que contenía 800 μ l de agua miliQ y 200 μ l de reactivo Bradford. La concentración de proteína se calculó mediante interpolación de los valores de absorbancia de una curva patrón obtenida a partir de cantidades crecientes de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma).

En ocasiones también se ha utilizado un espectrofotómetro (*NanoDrop*[®] *ND-1000*) que integra todos estos datos con sólo poner 1-2 μ l de nuestra muestra.

3.3. Ensayos de detección de actividad celulolítica

La actividad celulolítica de las cepas tipo de *Rhizobium* así como de las cepas de estudio y de los recombinantes obtenidos se llevó a cabo utilizando como sustrato carboximetil celulosa sódica, CMC (viscosidad media, Sigma), un compuesto soluble derivado de la celulosa, utilizado para la valoración de la actividad 1,4- β - glucanásica. Para ello se preparó una disolución al 1% (p/v) en agua miliQ que se diluyó con agua o tampón hasta las concentraciones adecuadas para los ensayos.

Los ensayos se llevaron a cabo bien utilizando cultivos bacterianos o bien extractos enzimáticos obtenidos por sonicación como a continuación se detalla.

3.3.1. Detección en cultivo celular

La detección de actividad carboximetilcelulásica de los cultivos celulares se llevó a cabo disponiendo las distintas colonias a ensayar, con la ayuda de un palillo estéril, sobre la superficie de placas “en doble capa” con medio de cultivo YMA.

Las placas se prepararon con dos capas de agar: la inferior, más gruesa, formada por 15 ml de medio sólido YMA y la superior compuesta por 5 ml de YMA a la que se le adicionó el sustrato (CMC) a una concentración final de 0,2% (p/v). Una vez sembradas, se incubaron a 28 °C hasta la aparición de crecimiento (3-5 días) y se revelaron para la detección de la actividad celulásica. Para ello, primero se eliminaron las células de la placa por lavado con agua destilada. Posteriormente se añadió a las placas de CMC una solución acuosa de Rojo Congo (Panreac) al 0,1% (p/v) durante 30 min. Se retiró el colorante y seguidamente se lavaron varias veces con NaCl 1M para contrastar las zonas correspondientes a los halos de hidrólisis enzimática del sustrato, que no se tiñen con Rojo Congo.

3.3.2. Detección en extractos celulares por difusión radial en placa

Se utilizó la técnica de difusión radial en placa descrita por Saleh-Rastin *et al.* (1991), modificada por Mateos *et al.* (1992) para *Rhizobium*. Las placas se preparan con doble capa de agarosa. La inferior, más gruesa, formada por 15 ml de agarosa (Cambrex Bio Science) en disolución acuosa al 0,7% (p/v) y la superior por 5 ml de agarosa al 0,5% en tampón PCA 100 mM pH 5,0. En esta última se adiciona el sustrato (CMC) a la concentración final del 0,2% (p/v).

Los ensayos se realizaron disponiendo sobre la superficie de agarosa 20 μ l de las soluciones enzimáticas normalizadas. Las placas se incubaron 12 h a 37 °C y se revelaron para la detección de la actividad según se describió anteriormente (*ver el apartado 3.3.1*).

3.3.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los perfiles de isoenzimas con actividad celulásica fueron analizados mediante electroforesis en condiciones semidesnaturalizantes (SDS-PAGE) de los diferentes extractos sonicados y posterior zimograma sobre gel de agarosa con CMC, siguiendo la metodología descrita por Mateos *et al.* (1992). Estos experimentos se llevaron a cabo con la exclusión del agente desnaturante (SDS), tanto de los geles de separación como de los de empaquetamiento, y disminuyendo su concentración a la mitad respecto a la que se utiliza tradicionalmente en el tampón de cubeta y en el de la muestra, que no es hervida previamente. Estas son las condiciones que permiten la posterior renaturalización de las proteínas en tampón PCA 10 mM y con ello la detección fiable de los isoenzimas producidos por las cepas de estudio.

La electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS en tampón de cubeta y DTT o β -mercaptoetanol en tampón de muestra y hervido de las muestras) no permite la renaturalización de las proteínas separadas y en consecuencia la posterior detección de la actividad celulolítica correspondiente a las celulasas (Jiménez-Zurdo, 1993), pero sirve para la mejor visualización de las proteínas en los geles de poliacrilamida.

3.3.3.1 Condiciones electroforéticas

Las electroforesis se llevaron a cabo en geles de poliacrilamida de 0,75 mm de espesor, en cubeta Mini Protean II (Bio-Rad), siguiendo un método basado en el descrito por Laemmli (Laemmli, 1970).

Para las electroforesis en condiciones semidesnaturalizantes con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) se utilizaron siempre geles continuos de poliacrilamida al 12% el de separación (en tampón Tris-HCl 0,5M pH 6,8) y al 4% el de empaquetamiento (en tampón Tris-HCl 1,5M pH 8,8) sin SDS. La composición de ambos es la que se detalla a continuación.

| Composición geles | Gel de empaquetamiento | Gel de separación (Vol) |
|---------------------------------|------------------------|-------------------------|
| H ₂ O | 3,25 ml | 4,5 ml |
| Tampón Tris-HCl | 1,25 ml | 2,5 ml |
| Acri/Bis ¹ (Bio-Rad) | 500 µl | 3,0 ml |
| APS ² (Bio-Rad) | 25 µl | 50 µl |
| TEMED (Bio-Rad) | 5 µl | 5 µl |

¹Disolución al 40% de acrilamida/n, n'-metilenbisacrilamida (37,5:1) (Bio-Rad).

²Persulfato amónico 10% (p/v) preparado en agua destilada.

El agente desnaturante (SDS, Dodecil Sulfato Sódico) se excluyó de ambos geles, pero se mantuvo en el tampón utilizado en la cubeta de electroforesis, cuya composición fue la siguiente:

| Composición tampón cubeta | g/l |
|---------------------------|------|
| Tris Base (Fluka) | 3,0 |
| Glicocola (Bio-Rad) | 14,4 |
| SDS (Sigma) | 0,5 |

Las muestras se mezclaron, antes de su aplicación en los pocillos, con el tampón de muestra en la relación 4:1 (v/v). La composición del tampón de muestra fue la siguiente:

| Composición tampón muestra | Volumen |
|---|---------|
| SDS 10% | 5,0 ml |
| Glicerol (Panreac) | 3,0 ml |
| Azul de bromofenol [0,5% (p/v)] (Bio-Rad) | 200 µl |
| H ₂ O | 1,6 ml |

En el caso de las electroforesis en condiciones desnaturantes, se añadieron 100 µl de dodecil sulfato sódico al 10% (SDS) en los geles de poli(acrilamida) y el doble de concentración en el tampón utilizado en la cubeta de electroforesis (1 g/l). También se añadió 1 mM DTT en el tampón de carga y las muestras se calentaron durante 3-5 min a 100°C para desnaturarlas antes de cargar el gel.

En ambos casos, las electroforesis se llevaron a cabo empleando una cubeta Miniprotein II (Bio-Rad) que emplea como moldes placas de vidrio de 7 x 10 cm, a un voltaje constante de 200 V en una fuente de alimentación de Bio-Rad hasta la llegada del frente al final del gel de separación (aproximadamente unos 45 min).

.3.3.3.2 Revelado de actividad celulolítica

Para la detección de la actividad celulolítica después de SDS-PAGE, las proteínas separadas en los geles de poliacrilamida se renaturalizaron por incubación de los mismos en tampón PCA 10 mM pH 5,0 durante 2 h con cambios periódicos del tampón cada 30 min.

Los geles de agarosa sobre los que se detectaron las bandas de hidrólisis enzimática (CMC al 0,2% (p/v) y agarosa al 0,5% (p/v) en tampón PCA 100 mM pH 5,0) se construyeron sobre la parte hidrofílica de un soporte plástico (Electrophoresis film, Sigma) en moldes de vidrio de 7 x 10 cm y 0,4 mm de espesor.

Después de la renaturalización de las proteínas, el gel de separación se puso en contacto con el gel de agarosa preparado sobre el soporte y se incubó a 37 °C durante al menos 12 h en una cámara húmeda. Tras la incubación, ambos geles se separaron y las zonas de hidrólisis enzimática se visualizaron por inmersión del gel de agarosa en una disolución acuosa de Rojo Congo al 0,1% durante 30 min y posterior decoloración por lavados sucesivos del mismo con NaCl 1 M.

.3.3.3.3 Tinción de proteínas

La visualización de las bandas proteicas separadas electroforéticamente se realizó por tinción de las mismas manteniendo el gel en agitación constante durante 30 min inmerso en una disolución de Azul Coomassie (Bio-Rad). Antes y después de la inmersión el gel se lavó varias veces con agua destilada.

Cuando la concentración de proteínas en la muestra era baja o no pudieron ser detectadas mediante tinción con Azul Coomassie, se llevó a cabo la tinción con nitrato de plata, un método que goza de una sensibilidad mayor para la visualización de las proteínas. Para ello, se utilizó un método descrito anteriormente (Morrissey, 1981), que consta de un primer paso de fijación de las proteínas por inmersión sucesiva del gel en distintas soluciones: primero durante 20 min en una solución metanol:acético:agua (5:1:4), a continuación en metanol:acético:agua (0,5:0,7:8,8) durante 10 min y por último en glutaraldehído al 5%, durante 20 min. Posteriormente, se llevaron a cabo sucesivos lavados con agua miliQ durante 3 h con cambios periódicos cada media hora. A continuación, para la reducción de puentes disulfuro se utilizó una disolución acuosa de ditiotretol (DTT, Sigma) 0,25 mM durante 20 min. Finalmente, el gel se tiñó por inmersión en una disolución de AgNO₃ (Sigma) al 0,1% (p/v) y se reveló con una disolución de Na₂CO₃ 280 mM en formaldehído al 0,05%. Lograda la visualización correcta de las bandas de proteínas la reacción de revelado se detuvo con la adición de ácido cítrico 2,3M.

3.3.4. Cuantificación de la actividad celulolítica

La actividad celulolítica se cuantificó por valoración de los grupos reductores formados tras la hidrólisis del sustrato correspondiente. El procedimiento seguido se fundamentó en el método descrito anteriormente (Waffenschmidt y Jaenicke, 1987) y modificado por Mateos *et al* (1992). El sustrato utilizado fueron los extractos enzimáticos obtenidos por sonicación como se describió en el apartado 3.1 de esta sección.

La mezcla de reacción consistió en 0,4 ml de la disolución de sustrato al 1% (CMC) y 0,1 ml de la solución enzimática, tamponada a pH 5,0 con 1,1 ml de PCA (100 mM). Después de mezclar bien los reactivos se tomó una alícuota de 0,8 ml que se congeló a -80 °C y que se consideró como muestra representativa del tiempo cero de reacción.

El resto se incubó a 40 °C en baño termostatzado durante 5 h. Los grupos reductores generados se valoraron con un reactivo formado por la mezcla de volúmenes iguales de dos disoluciones, A y B, cuya composición se especifica a continuación.

| Composición disolución A | |
|--|----------|
| 4,4'-Dicarboxi-2,2'-Biquinolina (BCA, Sigma) | 216,6 mg |
| Na ₂ CO ₃ (Panreac) | 5,43 g |
| NaHCO ₃ (Panreac) | 2,42 g |
| H ₂ O destilada | 100 ml |

Para la preparación del reactivo se disuelven primero el carbonato sódico y el bicarbonato sódico. El BCA es un compuesto poco soluble en agua, por lo que se tuvo que disolver en un baño termostatzado a una temperatura nunca superior a 60 °C. Ambas disoluciones se conservaron a 4 °C y en oscuridad durante un periodo máximo de 4 semanas.

| Composición disolución B | |
|--|--------|
| CuSO ₄ ·5H ₂ O (Sigma) | 124 mg |
| L-Serina (Sigma) | 126 mg |
| H ₂ O destilada | 100 ml |

La reacción colorimétrica para la valoración de los grupos reductores se llevó a cabo en tubos de ensayo añadiendo 1 ml del reactivo de revelado (A+B, 1:1) (preparado en el momento de su utilización) a alícuotas de 0,2 ml de cada

mezcla de reacción, a tiempo cero y 5 h, diluidas con 0,8 ml de agua miliQ. Los tubos se cerraron herméticamente y se calentaron a 100 °C durante 15 min. Posteriormente los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 20 min y se midió la densidad óptica a 540 nm en un espectrofotómetro Unicam 8625. El blanco consistió en 1 ml de agua miliQ y 1 ml de solución A+B 1:1.

Se tomó como valor de absorbancia real la diferencia entre la media de las medidas para tiempo de reacción 5 h y la correspondiente absorbancia a tiempo cero. Al mismo tiempo, y siguiendo idéntica metodología, se hicieron rectas patrón de glucosa (Panreac) en concentraciones comprendidas entre 0,4 y 2,0 µg/ml, respecto a las que se cuantificó la actividad celulolítica.

Una unidad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que libera 1 nmol del azúcar reductor equivalente (glucosa) por min a 40 °C y pH 5,0. La actividad enzimática específica se expresó como unidades enzimáticas por mg de proteína.

3.4. Purificación de la proteína CelC2

La purificación de la celulasa C2 se llevó a cabo para conocer mejor su implicación a lo largo del proceso infectivo en varios experimentos en los que era necesario usar una solución del enzima purificado. En una primera aproximación, se llevó a cabo la sobreexpresión de la proteína CelC2 utilizando el sistema IMPACT™ (New England Biolabs®), ya que presenta la ventaja de producir la liberación de la proteína recombinante sin colas adicionales. Para ello, se clonó el gen bajo el control del promotor T7-operador *lac* en los vectores de expresión pTXB1 y pTYB11, es decir, se realizó una fusión C-terminal y otra N-terminal de la proteína de estudio a un fragmento que codifica una inteína para su posterior purificación en una columna de quitina. La sobreexpresión del sistema se llevó a cabo en la cepa de *E.coli* ER2566 que presenta una copia de la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lac*. Así, en presencia de IPTG como inductor del operón *lac*, se debe liberar la represión de todo el sistema obteniendo grandes cantidades de proteína. Sin embargo, bajo ninguna de las condiciones de cultivo que fueron probadas (distintas concentraciones de IPTG, temperaturas y tiempos de cultivo) se logró observar, tras sonicación de las células, una sobreexpresión clara de la proteína CelC2.

Por ello, se decidió diseñar una estrategia basada en el método utilizado anteriormente para la purificación de esta proteína a partir de células de *Rhizobium* (Robledo *et al.*, 2008) con algunas modificaciones. Este método se había puesto a punto a partir de un cultivo de 15 L de la cepa silvestre de *R. leguminosarum* biovar trifolii ANU843, por la pequeña cantidad del enzima que era detectada. Sin embargo, en este caso se utilizó únicamente un cultivo de 2 L de la cepa superproductora de la celulasa CelC2, *R. leguminosarum* biovar trifolii E11C2⁺, ya que sólo tiene en su genoma la celulasa C2 y por tanto no porta ninguna copia de la celulasa C1, facilitando la purificación de la primera. Esta cepa fue obtenida por transformación de la cepa silvestre E11 con el plásmido pJZC2. Se partió de un cultivo en 2 L de medio YMA con el correspondiente antibiótico, a 28°C y en agitación hasta el inicio de su fase estacionaria de

crecimiento (aproximadamente 10^9 células/ml). Después de la centrifugación y posterior sonicado de las células en tampón Tris-HCl 100 mM pH 8, se obtuvo un extracto enzimático crudo.

Una vez preparada la resina de intercambio aniónico en DEAE-Sefarosa Fast Flow (10 ml, Pharmacia), se aplicó el extracto enzimático de la muestra directamente sobre la matriz intercambiadora, tras retirar el tampón sobrante de la parte superior. Después de la elución de las proteínas no retenidas con tampón Tris-HCl 10 mM pH 8, se añadió NaCl 0,25 M en el mismo tampón para la separación de las proteínas unidas a la matriz de DEAE-Sefarosa, ya que es la concentración óptima a la que eluye la celulasa CelC2 (Robledo *et al.*, 2008). El flujo de elución aplicado fue de 1,5 ml/min, recogiendo fracciones de 5 ml. En todas las fracciones se evaluó la actividad celulolítica mediante el ensayo en placa, no detectándose actividad en las fracciones correspondientes a las proteínas no retenidas, mientras que la celulasa se unió a la resina como era esperado, separándose con la concentración de sal aplicada.

Tras llevar a cabo una electroforesis de proteínas y posterior revelado de actividad de dichas fracciones, aquellas en las que el enzima CelC2 fue detectado con mayor claridad se reunieron. El volumen recogido correspondiente a la celulasa C2 se concentró en un volumen final de 5 ml en células de ultrafiltración Amicon Ultra 15 con membrana carente de celulosa según las instrucciones del fabricante.

A continuación se llevó a cabo una cromatografía de interacción hidrofóbica en columna de Fenil Superosa HR 5/5 (10 ml, Pharmacia Biotech). La solución conteniendo la celulasa C2, obtenida en la etapa anterior, se tamponó a pH 5 por adición de un volumen idéntico al de la disolución obtenida de tampón PCA 50 mM pH 5 y posteriormente se le añadió sulfato amónico hasta una concentración 0,2 M. La muestra así preparada se aplicó a la columna para, posteriormente, eluir las proteínas no retenidas en la misma con una disolución de PCA 10 mM pH 5 y, finalmente, con agua miliQ. Se recogieron fracciones de 1 ml cuya actividad celulolítica fue evaluada mediante el ensayo cualitativo en placa y se cuantificó por medida de azúcares reductores con BCA en aquellas en las que fue detectada. Además en cada una de ellas se midió la absorbancia a 280 nm como estimación de su contenido proteico.

Las proteínas contenidas en la muestra eluyeron mayoritariamente con el tampón en el que se equilibró la columna, no reteniéndose en la matriz. La celulasa C2 se retuvo y eluyó con el agua miliQ, aproximadamente, en un único pico constituido por las fracciones 10 y 15. Las fracciones con actividad celulolítica obtenidas en el último paso de la purificación se comprobaron mediante una electroforesis SDS-PAGE con posterior revelado con Nitrato de Plata. La fracción Q14, que consistió prácticamente en una única banda, fue dializada con agua miliQ. Por tanto, mediante este procedimiento, se obtuvo una aparentemente pura 1,4-β-D-glucanasa, en una única fracción de 1 ml en la que la cantidad de proteína resultó ser de 0,75 mg, la actividad celulolítica total fue de 6,66 U y la específica de 9,0 U/mg.

3.5. Determinación de la producción de celulosa

La actividad celulolítica de las cepas tipo de *Rhizobium* así como de las cepas de estudio y de los recombinantes obtenidos se llevó a cabo utilizando distintos métodos cualitativos utilizando distintos colorantes como el Rojo Congo (Sigma) o el Calcoflúor (Sigma) y ensayos indirectos como la determinación de la floculación. Los ensayos se llevaron a cabo bien utilizando cultivos bacterianos o bien extractos obtenidos por sucesivas digestiones como a continuación se detalla.

3.5.1. Ensayos utilizando colorantes

.3.5.1.1 Tinción con Rojo Congo

La producción de celulosa fue determinada cualitativamente mediante el cultivo de las cepas en estudio en placas de YMA que contenían 25mg/l de Rojo Congo, un compuesto capaz de unirse a polímeros de 1,4- β glucosa, utilizado para la detección de celulosa. Las distintas colonias a ensayar se dispusieron, con la ayuda de un palillo estéril, sobre la superficie de las placas y éstas se dejaron crecer durante 5 días a 28°C. Trascurrido este tiempo, las placas fueron fotografiadas con una cámara Lumix sobre un transiluminador.

.3.5.1.2 Tinción con Calcoflúor

Esta tinción se llevó a cabo para la visualización microscópica de las microfibrillas de celulosa. Este colorante es capaz de unirse a polímeros de glucosa que presenten enlaces β , de los cuales la celulosa es el único conocido en *Rhizobium* que se dispone en el exterior de las células formando este tipo de estructuras, ya que los β (1,2)-glucanos son polímeros cíclicos que no forman microfibrillas. Para ello, tras 5 días de crecimiento en placas de YMA con los respectivos antibióticos, se tomó un asa de las distintas cepas de estudio que fue resuspendida cuidadosamente en 1 ml de agua estéril destilada. A continuación, se tomaron 5 μ l de esta suspensión que fueron colocados en cada uno de los portas de 12 pocillos de 5 mm de diámetro recubiertos de Teflón (Electron microscopy science).

Una vez distribuidos, se dejaron secar toda la noche y al día siguiente se fijaron suavemente a la llama. Tras dejarlos enfriar, se incubaron durante 10 minutos en una disolución acuosa de Calcoflúor al 0,025%. Tras limpiar suavemente los pocillos con agua miliQ estéril y dejar secar completamente, se añadió una gota de “Vectashield” para realzar la fluorescencia.

3.5.2. Ensayos de floculación y tratamiento con celulosas de los agregados

Los ensayos de floculación se utilizaron como método indirecto para cuantificar el grado de agregación de las cepas de estudio y se llevaron a cabo básicamente como se ha descrito previamente (Da Re *et al.*, 2007). Las cepas de estudio fueron inoculadas en tubos con 3ml de medio YMB. Tras 15 horas de crecimiento a 28°C con agitación a 180 r.p.m., los cultivos fueron diluidos con medio YMB de forma que todos contuvieran 3 ml a una D.O._{600nm} de 0,6. Los tubos se incubaron de nuevo a 28°C pero esta vez en ausencia de movimiento. Tras 24h se midió la D.O._{600nm} de la parte superior del cultivo, tomando una muestra 1 cm por debajo de la interfase cultivo-aire. Estas pruebas se realizaron por triplicado.

Para confirmar si los flóculos que se forman en los cultivos son debidos a la celulosa y, por tanto, se disuelven por el tratamiento con celulasa, se llevó a cabo el tratamiento de los agregados con una celulasa comercial. Para ello, se tomaron cultivos de 30 ml de YMB de la cepa de estudio y, tras 5 días de crecimiento en medio líquido a 28°C en agitación, se dejaron reposar durante 2 días hasta la completa precipitación de los flóculos. A continuación, se tomaron los 5 ml del fondo del matraz que contenían los flóculos y se centrifugaron a 3500 r.p.m. durante 5 min en una centrifuga Eppendorf®. Se retiró el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en una solución 10U/ml de celulasa comercial producida por *Trichoderma viride* (Sigma) (se define 1U como la cantidad de celulasa que libera 1 µg de glucosa por hora a 37°C y pH 5) en PCA 100 mM pH 5. Como control negativo, paralelamente se tomó otro cultivo que fue resuspendido en tampón sin la enzima. Antes de la incubación, se comprobó que ambas soluciones seguían presentando los flóculos característicos de la cepa de estudio que se forman en YMB. Las soluciones se incubaron durante 2 horas a 37°C en agitación a 200 r.p.m. Tras dicho tiempo, se comprobó la ausencia o presencia de flóculos en suspensión.

3.6. Determinación de la formación de biofilms *in vitro*

Los ensayos relacionados con la formación de biopelículas en distintos sustratos inertes fueron llevados a cabo como se describió anteriormente (Fujishige *et al.*, 2006a) con algunas modificaciones. En todos los casos, el inóculo inicial se preparó a partir de cultivos en medio líquido TY o en medio mínimo de las cepas de estudio (en ocasiones marcadas con GFP) a los que se adicionaron los antibióticos correspondiente y se incubaron a 28°C en agitación a 180 r.p.m. durante 2-3 días, hasta la fase de latencia (densidad óptica a 600 nm, alrededor de 2,0). Estos cultivos se centrifugaron y lavaron con agua destilada estéril para ser finalmente diluidos en el mismo medio a una D.O._{600nm} de 0,2 (aproximadamente 1×10^7 cél. / ml) para llevar a cabo todos los ensayos posteriores.

3.6.1. Ensayos en placas de microtitulación de poliestireno

El ensayo en placas de microtitulación resulta muy útil para determinar la capacidad de adhesión bacteriana a sustratos abióticos ya que permite realizar estimaciones cuantitativas. Se tomaron 2 ml de cultivos preparados como se ha descrito anteriormente, y se repartieron en alícuotas de 100 μ l hasta completar 20 pocillos de cada cepa dentro de los 96 pocillos individuales de PVC de las placas (Falcon 3911, Dickinson Becton, Franklin Lakes, Nueva York) (Figura 21 A). Los pocillos externos se dejaron vacíos por precaución y algunos se rellenaron con medio de cultivo como control de esterilidad y control negativo en las lecturas del espectrofotómetro. Las placas se sellaron y se incubaron a 28 ° C durante 24, 48 o 72 h sin agitación.

Tras estos periodos de tiempo, el medio fue eliminado mediante absorción por vacío para eliminar las células no unidas al sustrato. A continuación, las bacterias que quedan en los pocillos se sometieron a tinción con 100 μ l de una solución al 0,3% de cristal violeta (Sigma) durante 10 min. Después se retiró el colorante y se retiraron los excesos de tinte mediante tres lavados sucesivos con 100 μ l con agua destilada, esperando 5 min entre uno y otro. Tras el último lavado, se dejó que los pocillos se secan durante 1 h a temperatura ambiente. Por último, el cristal violeta se solubilizó con una solución de etanol: acetona 4:1 y se cuantificó mediante la medida de la absorbancia a 570 nm en un lector de placas ASYS (Biochrom, Reino Unido).

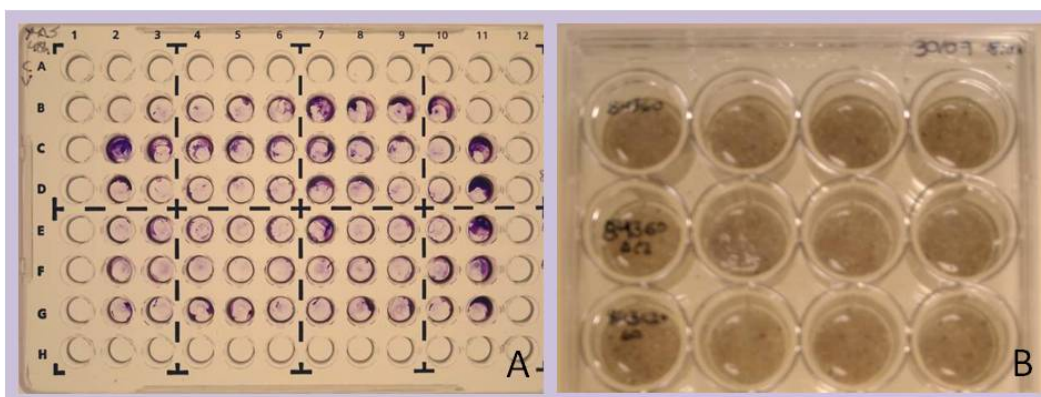


Figura 21. Placas utilizadas para los ensayos relacionados con la formación de biopelículas en distintos sustratos inertes. A) Placas de microtitulación tras la tinción con cristal violeta. B) Placas Costar conteniendo arena tras ser inoculadas con los cultivos de *Rhizobium*.

3.6.2. Ensayos en placas de PVC

La visualización de la formación de biopelículas en superficies de PVC se llevó a cabo mediante la transferencia de 0,5 ml de cultivo de cada cepa a $D.O_{600nm} = 0,2$ a cada uno de los pocillos individuales de placas Costar que contenían una lámina de PVC de 1 mm de ancho, quedando ésta inmersa en el medio de cultivo por un lateral. Tras una semana a 28° C, las láminas fueron retiradas asépticamente y se colocaron en portas escavados para ser examinadas bajo un microscopio de fluorescencia y así poder apreciar la arquitectura tridimensional de los biofilms formados por las bacterias marcadas con la proteína fluorescente verde.

3.6.3. Ensayos en placas Costar con arena como sustrato

La determinación cualitativa y cuantitativa de la capacidad de formación de biofilms sobre partículas de arena de las cepas de estudio fue llevada a cabo mediante la transferencia de 0,5 ml de cultivo a $D.O_{600nm}$ de 0,2 de cada cepa de cultivo a pocillos individuales de placas Costar que contenían 1 ml de arena estéril de tamaño de poro medio 5 μ m (Figura 21 B). Después de incubar las placas durante una semana a 28° C, se tomaron alícuotas de arena que fueron lavadas con agua estéril y posteriormente examinadas bajo un microscopio de fluorescencia confocal con el objetivo de poder apreciar la morfología de los biofilms y agregados que se forman alrededor de ellas.

Paralelamente, también se tomaron alícuotas de arena en tubos de 1,5 ml estériles previamente tarados. Se pesaron de nuevo para determinar el peso de las partículas de arena tomadas en cada ensayo, a los que se podrá referir el número de células en el conteo posterior. Las partículas de arena se lavaron con agua destilada estéril para eliminar las células no adheridas y finalmente, se añadió 1 ml de tampón T.E. estéril. Los tubos fueron sometidos a sonicación mediante baño de ultrasonidos Elmasonic (Singen, Alemania). Se aplicaron 2 pulsos de 1 min con un intervalo de 1 min entre ellos. Estas vibraciones hacen que las bacterias adheridas a las partículas de arena se disocien y queden resuspendidas en el tampón, que a su vez previene de la lisis de las células por el choque osmótico. Así, una vez finalizado este proceso, se realizaron diluciones seriadas del contenido de los tubos, que fueron sembradas en placas de TY-agar. A los 3 días, se llevó a cabo la cuantificación del número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). La eficiencia de cada cepa en la colonización y adhesión a las partículas de arena se estimó en función de las UFC referidas al peso de la arena tomada.

4. ENSAYOS CON PLANTAS

Estos ensayos se llevaron a cabo inoculando distintas plantas con las cepas de estudio y los mutantes obtenidos para analizar distintos aspectos del proceso de infección. En todos los ensayos se inocularon algunas plantas con una solución carente de microorganismos en las mismas condiciones que las demás como control negativo.

4.1. Semillas utilizadas en este estudio

En la realización de este trabajo se han empleado semillas de distintas especies vegetales. Entre las leguminosas empleadas, principalmente se han utilizado plantas de trébol blanco (*Trifolium repens* L. variedad HUIA) y de alfalfa (*Medicago sativa* L. variedad Aragón) que son noduladas por *Trifolium repens* y *Sinorhizobium meliloti*, respectivamente.

Algunos experimentos además incluyen plantas de *Medicago truncatula* variedad Jemalong ecotipos A17 y R108-1, cedidas por el grupo de Giles Oldroyd del departamento “Disease and stress biology” del John Innes Centre. Además, este grupo nos cedió también dos construcciones, una derivada del ecotipo A17, denominada L416 pMtENOD11-GUS (Charron *et al.*, 2004) y otra derivada del ecotipo R108-1 que contiene el plásmido p35S-yc2.1-kan insertado (Miwa *et al.*, 2006b).

Para la realización de los ensayos de tumorigénesis, se emplearon plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) y tabaco (*Nicotiana tabacum* L.).

4.2. Medios de cultivo utilizados

Para el estudio de las propiedades simbióticas, las plantas leguminosas se cultivaron en ausencia de nitrógeno empleando la solución nutritiva de Fähræus (Vincent, 1970) modificada tal y como se describe a continuación:

| Composición Medio Fähræus | g/l |
|---|-------|
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,12 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,10 |
| Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (Panreac) | 0,15 |
| Citrato férrico (Merck)* | 0,005 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O ² | 0,1 |

*Se preparó una solución de citrato férrico de concentración 500 mg/ml y se añadió 1 ml. ² Se preparó una solución 100 mg/ml y se añadió 1 ml al medio frío una vez esterilizado el medio de cultivo en el autoclave.

Además se añadió al medio 1 ml de una disolución de oligoelementos que contenía $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 y Na_2MoO_4 a una concentración de 1mg/ml. El pH de la solución de Fähræus se ajustó a 6,5-7 antes de esterilizarlo en el autoclave a 115 °C durante 30 min. Cuando fue necesario, el medio se solidificó con agar al 1,5%.

En el caso de las plantas de *M. truncatula*, se añadió al medio antes de ser solidificado 2-aminoetoxivinilglicina (AVG, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 10 mM para inhibir la producción de etileno por parte de esta planta en cultivos en placa.

Para el cultivo en medio completo con nitrógeno se empleó la solución nutritiva Hoagland's n°. 2 diluida a la mitad (1:2) (Sigma). En ocasiones, fue preparada en el laboratorio a partir de las soluciones stock tal y como se describe a continuación:

| Composición Medio Hoagland's 1:2 | ml/l |
|--|------|
| 1M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ | 10 |
| 1M KNO_3 | 10 |
| 1M MgSO_4 | 4 |
| 1M KH_2PO_4 | 2 |
| Solución FeEDTA ¹ | 2 |
| Solución de micronutrientes ² | 2 |

¹La solución FeEDTA contiene 7.45/l de Na_2EDTA (etilendiaminotetraacetato disódico) y 5.57 g/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. ²La solución de micronutrientes contiene los siguientes compuestos:

| Solución de micronutrientes | g/l |
|---|-------|
| H_2BO_3 | 2,86 |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 1,81 |
| ZnCl_2 | 0,11 |
| $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,05 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,025 |

Tras la preparación, el pH se ajustó a 5,7-5,8.

4.3. Esterilización y germinación de las semillas

Para esterilizar la superficie de las semillas sin producir la muerte del embrión, éstas fueron desinfectadas en su superficie utilizando el método de Vincent (1970). Esta esterilización se llevó a cabo mediante tratamiento de las semillas con una cantidad de etanol al 70% suficiente para cubrirlas durante 30 s. Se decantó el etanol y a continuación se añadió una solución de HgCl₂ (Panreac) al 2,5% (p/v), manteniéndolo en agitación durante 5 min.

Las semillas se lavaron y aclararon 6 veces con agua estéril y posteriormente se mantuvieron en imbibición durante 2-3 horas. Una vez así esterilizadas se lavaron de nuevo y se extendieron sobre la superficie de una placa de Petri con medio sólido Fåhraeus modificado. Se les añadió 2 ml de agua estéril, se dejaron reposar 5 min. A continuación se invirtieron las placas y se mantuvieron en oscuridad durante aproximadamente 24 – 48 horas a 28° C, hasta que las plántulas alcanzaron 1 cm.

Para la esterilización de las semillas de *M. truncatula* se incluyó un paso previo de escarificación con papel de lija para favorecer la germinación. A continuación, se colocaron en una solución de lejía comercial durante 1 min para su completa esterilización. Tras este tiempo se lavaron repetidamente con agua destilada estéril y se mantuvieron en imbibición en agua destilada estéril durante 5 horas. Finalmente, se colocaron en placas de agar-agua al 1%. Las semillas se incubaron en oscuridad durante 24-48 horas a 4 °C y fueron germinadas a temperatura ambiente durante 30 h.

4.4. Ensayos *in vitro* a cortos periodos de tiempo

Este apartado recoge aquellos ensayos con plantas que se llevaron a cabo en cultivo monoxénico, manteniendo las plantas generalmente en placas de Petri como paso previo para tratamientos y diferentes determinaciones tras periodos que oscilan entre unas horas o varios días, tal y como se describe a continuación.

4.4.1. Ensayos de infectividad

Sobre la superficie de placas de Petri de 9 mm de diámetro con medio sólido Fåhraeus modificado se colocó un papel de filtro estéril circular recubriendo el medio, se añadió 1 ml de agua estéril y se colocaron, con la ayuda de un asa de siembra, 5-10 semillas germinadas por placa, que fueron incubadas en oscuridad a 28 °C durante 48 h.

A continuación, se tomaron cultivos de 5 días de *Rhizobium* crecidos a 28 °C en YMA con sus correspondientes antibióticos, para realizar una suspensión en

medio líquido Fåhraeus modificado. Esta suspensión se utilizó para añadir 200 µl de inóculo (D.O.₆₀₀: 0,5) por planta a cada placa.

Finalmente se añadió 1 ml de agua estéril a cada placa, que fue sellada con Parafilm® y colocada en vertical sobre un soporte mantenido a temperatura ambiente y en oscuridad. Al cabo de dos días fueron trasladadas a una cámara iluminada con mezcla de luz incandescente y fluorescente programada para un fotoperíodo de 16 h a una temperatura entre 25 °C- 17 °C para el ciclo día-noche respectivamente y un 60% de humedad relativa. La mitad inferior de las placas se cubrió para dar sombra a las raíces hasta que fueron utilizadas para los diferentes ensayos.

4.4.2. Medida de los pulsos de Ca²⁺

Los cambios en los niveles de calcio intracelulares de los pelos radicales (*calcium spiking*) de la planta *M. truncatula* se midieron utilizando la línea transgénica YC2.1 que expresa la calmodulina quimérica que actúa como sensora del calcio denominada “*cameleon*” bajo el promotor del 35S (Miwa *et al.*, 2006a). Para ello, plántulas recién germinadas de esta línea transgénica fueron trasplantadas a placas con medio Fåhraeus sólido. Después de 1 ó 2 días, las plantas fueron cuidadosamente colocadas en unas cámaras creadas con silicona sobre los portas, en las que se fijaron para ser directamente observadas al microscopio tal y como se describe en el apartado 5.2.

Posteriormente se añadieron los Factores Nod (NF) a una concentración final de 10 pM como control positivo de la habilidad de los pelos radicales de iniciar la producción de pulsos de calcio. Los NF fueron facilitados por el grupo de Giles Oldroyd del departamento “Disease and stress biology” del John Innes Centre y habían sido previamente purificados y cuantificados según métodos estándar (Ehrhardt *et al.*, 1996). Los pelos radicales fueron visualizados durante al menos 30 min y después se retiró cuidadosamente con una pipeta el medio conteniendo los NF y se añadió una solución de la misma concentración de NF fresca igual a la anterior (como control de que el cambio de medio no interfería en la visualización del “*spiking*” de calcio) o bien conteniendo además 5 pg/µl (1U) del enzima CelC2, para determinar su influencia sobre los pulsos de calcio. Este tratamiento se realizó desde el borde de la zona que contenía el líquido de incubación, dejando difundir lentamente alrededor de la planta, para no interferir en los pelos radicales que se estaban visualizando con el microscopio.

Durante el tiempo total de visualización de cada muestra (aproximadamente 1 h), se determinó la intensidad media de FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) desde la proteína cian (CFP) hacia la proteína fluorescente amarilla (YFP) cada 5 s en los píxeles de las regiones de interés en cada punto de datos. Los cambios en el ratio YCP:CFP para cada punto de muestreo fueron calculados dividiendo los valores de intensidad YFP entre los obtenidos para CFP tras exportar todos los datos a una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel, que además se usó para representar este parámetro gráficamente en función del tiempo.

4.4.3. Análisis de la expresión de nodulinas tempranas

Estos ensayos se llevaron a cabo utilizando plantas de la línea transgénica de *M. truncatula* 416K, que portan el gen informador GUS bajo el promotor de ENOD11. Tal y como se ha descrito previamente (Ding *et al.*, 2008), estas plantas fueron trasplantadas a medio Fåhræus modificado sin nitrógeno sólido tras la germinación, donde permanecieron 3 días en las condiciones indicadas en el apartado 4.4.1. A continuación, fueron inoculadas con 100 µl de una suspensión de las cepas de estudio a una D.O.₆₀₀ 0.5 o bien con 1 pM de NF, con o sin 5 pg/µl (1U) de la proteína CelC2.

A diferentes tiempos post-inoculación, las plantas fueron recogidas para llevar a cabo la tinción con GUS. Esta se realizó sumergiendo las mismas en la solución de revelado:

| Solución de revelado (GUS) | Concentración |
|---|---------------|
| Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol-β- glucurónico (X-Gluc) | 1 mM |
| EDTA | 5 mM |
| Metanol | 20% |
| KH ₂ PO ₄ | 0,1 M |

La mezcla se incubó durante 2h a 37°C y posteriormente las raíces fueron observadas y fotografiadas con la lupa estereoscópica. Los experimentos se repitieron tres veces con al menos 6 plantas por ensayo.

Para evaluar la actividad GUS cuantitativamente, se llevaron a cabo ensayos fluorimétricos (Jefferson *et al.*, 1987). Para ello, al menos seis raíces de plantas cultivadas en las condiciones que se describieron anteriormente fueron recogidas en nitrógeno líquido y conservadas a -70°C hasta que se procedió a la extracción proteica. Para ello, en primer lugar las plantas fueron pulverizadas con la ayuda de morteros de porcelana sobre nitrógeno líquido. El tejido vegetal obtenido fue traspasado a tubos de 1,5 ml y resuspendido en 100 µl de tampón de extracción GUS, cuya composición es la siguiente:

| Tampón de extracción (GUS) | Concentración |
|--|---------------|
| Tampón NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ pH 7,5 | 50 mM |
| 2-mercaptoetanol | 10 mM |
| EDTA | 10 mM |
| Triton X100 | 0,1% |
| SDS | 0,1% |

Tras homogeneizar la muestra con ayuda de un *vórtex*, ésta se sometió a centrifugación a 13.000 r.p.m. y 4° C durante 15 min. El sobrenadante se llevó a nuevos tubos de 1,5 ml y se continuó con la cuantificación proteica y la determinación fluorimétrica inmediatamente o se conservó a – 80 °C.

Una vez realizada la extracción proteica, se llevó a cabo la determinación de la concentración de cada muestra diluida por el método de Bradford tal y como se describe en el apartado 3.2. Por último, se llevaron a cabo las reacciones enzimáticas en un volumen final de 200 μ l que fueron repartidos en placas multipocillo. Cada reacción contenía 100 μ l de tampón GUS conteniendo 1 μ g de proteína y 100 μ l de tampón GUS conteniendo 1mM 4- metilumbeliferil- β -D-ácido glucurónico (4-MUG, Sigma-Aldrich) como sustrato preparado en fresco cada vez que se llevó a cabo la reacción. Como blanco, se utilizaron los mismos reactivos pero sin contener proteína y como control negativo, solamente 200 μ l de tampón GUS. Las placas se incubaron durante 1h a 37°C en oscuridad. La reacción se terminó añadiendo 50 μ l 1M Na₂CO₃ a cada pocillo. La actividad GUS fue medida con un lector de placas fluorimétrico (FL600, Bio-Tek, Highland Park, VT, U.S.A.) utilizando una longitud de onda de excitación de 360 nm y una banda de emisión centrada en 460 nm. Los resultados se obtuvieron extrapolando los valores obtenidos según una curva patrón obtenida con soluciones de concentraciones crecientes (1-100 μ M) de 4-metilumbeliferona (4-MU, Sigma-Aldrich) preparadas en tampón GUS.

4.4.4. Ensayos de respuesta de defensa en la planta

Estos ensayos se llevaron a cabo de forma similar a los de infección, pero utilizando placas de Petri cuadradas de 10x10 cm que contenían medio Fåhraeus libre de nitrógeno recubierto con una pieza de papel de filtro Whatman n ° 1 de 9x9 cm estéril con un mayor número de plantas (10-25). Las semillas germinadas de las plantas de estudio con raíces rectas se colocaron sobre el papel de filtro, sobre el que se añadieron 4 ml de agua estéril. Las placas se incubaron a temperatura ambiente verticalmente en la oscuridad durante 48 horas y luego fueron trasladados a la cámara iluminada. Después de 5 días, las placas se inocularon con 80 μ l por planta de una suspensión de las cepas de estudio crecidas durante 5 días en YMA a una concentración de D.O._{600nm} 0,5 en medio Fåhraeus sin nitrógeno y las plantas control fueron inoculadas únicamente con medio de cultivo. A continuación, las plantas fueron recogidas y sometidas a distintos tratamientos en función de la finalidad del ensayo, tal y como se describe a continuación.

4.4.4.1 Determinación de la producción de ácido salicílico (SA)

En los ensayos de determinación de la producción de ácido salicílico (SA) en *Trifolium repens* se partió de 25 plantas por cada placa, cuyas raíces fueron escindidas, pesadas y sometidas a congelación por inmersión en nitrógeno líquido a distintos tiempos tras la inoculación con las cepas de estudio. Las plantas se conservaron a -80°C hasta el momento en el que se sometieron al proceso de extracción y cuantificación del ácido salicílico total, libre y conjugado en forma de β -glucósidos, tal y como se ha descrito anteriormente en otras plantas (Bowling *et al.*, 1994; Enyedi *et al.*, 1992).

Para ello, los tejidos de la raíz, se trituraron en morteros de porcelana utilizando nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Aproximadamente 0.1-0.4 gramos de este material se homogenizó en 1 ml de metanol 90%, se sonicó 30 minutos en baño de ultrasonidos y se incubó a -20°C durante toda una noche. Tras una nueva sonicación de 10 minutos, las muestras se centrifugaron 15 min a 12000 r.p.m. El sobrenadante se recogió en un nuevo tubo mientras que el precipitado se sometió a una nueva extracción. Para ello, se añadió 0,5 ml de metanol 100%, se incubó 30 min a -20°C, se sonicó en baño de ultrasonidos durante 15 min y se centrifugó. Los sobrenadantes de ambas extracciones se mezclaron y se repartieron en volúmenes iguales en dos tubos. El extracto metabólico se secó en un SpeedVac[®] SPD1018 (Savant) aplicando calor (~40°C). Los residuos obtenidos se resuspendieron en 220 µl de una solución de acetato sódico 0,1M pH 4,5. A uno de los dos tubos se le añadió β-glucosidasa (SIGMA) (1 mg β-glucosidasa/ 20 µl AcNa 0,1M), con objeto de liberar el SA conjugado en forma de glucósidos. Las muestras se incubaron a 37°C durante una noche.

Tras este periodo de incubación, se añadió a las muestras 20 µl de ácido clorhídrico y se sometieron a una extracción con 2 volúmenes (400 µl) de etilacetato: ciclopentano: isopropanol (50:50:1). Tras recoger la fase superior, la fase acuosa se sometió a una segunda extracción. Las fases orgánicas resultantes se juntaron en un tubo, que se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el extracto seco de la fase orgánica conteniendo el ácido salicílico libre fue resuspendido en 80 µl de metanol 100%. Las muestras (2 µl) se analizaron en HPLC, con una columna Waters Spherisorb S3 ODS2 (USA) de 4,6 x 150 mm con un tamaño de poro de 3 µm. El SA fue separado de manera isocrática con metanol 30 % (v/v) y ácido acético 1% (v/v) a un flujo de 1,1 ml/min y 35°C. La detección del SA se llevó a cabo con un detector de fluorescencia Varian Prostar utilizando una longitud de onda de excitación de 313 nm y de emisión de 405 nm.

Finalmente, los niveles de salicílico fueron determinados en base al área de los picos utilizando una curva de calibración y estándares de ácido salicílico.

.4.4.4.2 *Acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS)*

Para analizar la acumulación de ROS endógeno en plántulas a distintos tiempos tras la inoculación con *Rhizobium*, se llevó a cabo el ensayo de fluorescencia con 2',7'-diclorodihidrofluorescein-diacetato (DCFDA, Sigma), un compuesto permeable que se oxida en presencia de H₂O₂ formando el compuesto altamente fluorescente 2', 7'-diclorodihidrofluoresceina (Ubezio y Civoli, 1994). Para llevar a cabo el ensayo, las plantas se colocaron cuidadosamente en un porta y se cubrieron completamente con una solución 10 µM DCFDA, preparada a partir de una solución madre 1mM (1000X) disuelta en DMSO que diluimos en agua destilada. Las plantas se incubaron durante 15 min a 25°C en oscuridad y posteriormente se lavaron cuidadosamente con agua estéril para eliminar los restos de fluorescencia.

A continuación, se añadió una solución 10 µM de ioduro de propidio (Sigma) para visualizar las raíces, que fueron cubiertas cuidadosamente con un cubre. Finalmente la fluorescencia emitida por este compuesto se detectó observando las muestras en un microscopio confocal de fluorescencia como se

describe en el apartado 5.3. Para el recuento del porcentaje de pelos radicales que mostraban respuesta ROS, caracterizada por la emisión de fluorescencia, se tomaron en cuenta aquellos pelos de unos 1-1,5 cm de largo presentes en la zona II de la raíz (Gage, 2004). Al menos tres plantas fueron analizadas en cada punto de muestreo y tratamiento.

Para corroborar que la fluorescencia era producida de forma específica debido a la producción de ROS, algunas plantas fueron tratadas con difenileno de iodonio (DPI), un inhibidor de la NADPH oxidasa, adaptando el método descrito anteriormente (Mazel *et al.*, 2004). Para ello, se añadió DPI a una concentración final de 20 μM al inóculo de *Rhizobium* y éste compuesto fue de nuevo puesto en contacto con las plantas 30 min antes del tratamiento con DCFDA como recuerdo para comprobar la inhibición de la respuesta ROS.

4.4.5. Ensayos de formación de biofilms *in planta*

Los ensayos relacionados con la determinación cualitativa y cuantitativa de la capacidad de formación de biofilms en plantas de *Trifolium repens* fueron llevados a cabo siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Fujishige *et al.*, 2006b) con algunas modificaciones. En todos los casos, el inóculo inicial se preparó a partir de cultivos en medio líquido tal y como se describe en el apartado 3.6 para los ensayos de formación de determinación de la formación de biopelículas *in vitro*. Además, para estos ensayos, se utilizaron plantas de trébol blanco que fueron esterilizadas, geminadas y cultivadas *in vitro* sobre placas de Petri conteniendo medio de cultivo sólido sin nitrógeno tal y como se describe en el apartado 4.4.1 de esta sección.

A los siete días de ser germinadas, aquellas raíces que tenían unos 5 cm de longitud fueron sumergidas en una solución conteniendo un cultivo a D.O._{600nm} de 0,2 de cada cepa de estudio durante 5 min. Después, se colocaron de nuevo en las placas y se depositaron en el fitotrón. Tras diferentes tiempos, según el objetivo del ensayo, las raíces fueron lavadas con agua estéril y posteriormente examinadas bajo un microscopio de fluorescencia confocal para poder apreciar la morfología de los biofilms y agregados que se forman alrededor de los pelos radicales y las raíces.

Para contar el número de rizobios adheridos a la raíz, tres días después de la inoculación, las plantas se lavaron tres veces con agua estéril y en agitación vigorosa para eliminar las células no adheridas, se secaron cuidadosamente en papel Whatman estéril para quitar el exceso de humedad y se introdujeron en tubos de 1,5 ml estériles previamente tarados. Tras volver a pesar los tubos para determinar el peso de las raíces se añadió 1 ml de tampón TE estéril (10 mM Tris-HCl, pH 7.5.; 1 mM EDTA). Los tubos fueron sometidos a sonicación mediante un baño de ultrasonidos Elmasonic (Singen, Alemania). Se aplicaron 2 pulsos de 1 min con un intervalo de 1 min entre ellos para disociar las células adheridas a las raíces, que quedan resuspendidas en el tampón. Así, una vez finalizado este proceso, se realizan diluciones seriadas del contenido de los tubos, que fueron sembradas en placas de medio sólido TY. A los 3 días, se lleva a cabo la cuantificación del número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). La

eficiencia de cada cepa en la colonización y adhesión a las raíces se estima en función de las UFC referidas al peso de la raíz tomada.

4.5. Cultivo de plantas

Este apartado recoge aquellos ensayos con plantas que se llevaron a cabo bien en cultivo monoxénico o en invernadero, manteniendo las plantas en tubos o macetas durante largos periodos de tiempo que oscilan entre varias semanas o meses para llevar a cabo ensayos de nodulación o de producción vegetal.

4.5.1. Ensayos de nodulación en cultivo monoxénico

Estos ensayos fueron realizados para monitorizar la capacidad de nodulación de las distintas cepas de estudio según el método descrito por Vincent (1970) modificado como se detalla a continuación. Sobre un tubo con 20 ml de medio de enraizamiento de Fåhræus modificado sin nitrógeno y un papel de filtro de 15 x 1,5 cm estériles se colocó con la ayuda de un asa de siembra estéril desechable, 1 semilla estéril germinada (Figura 22 A). Estos tubos se cerraron con algodón hidrófobo y se mantuvieron en oscuridad durante 2 días.

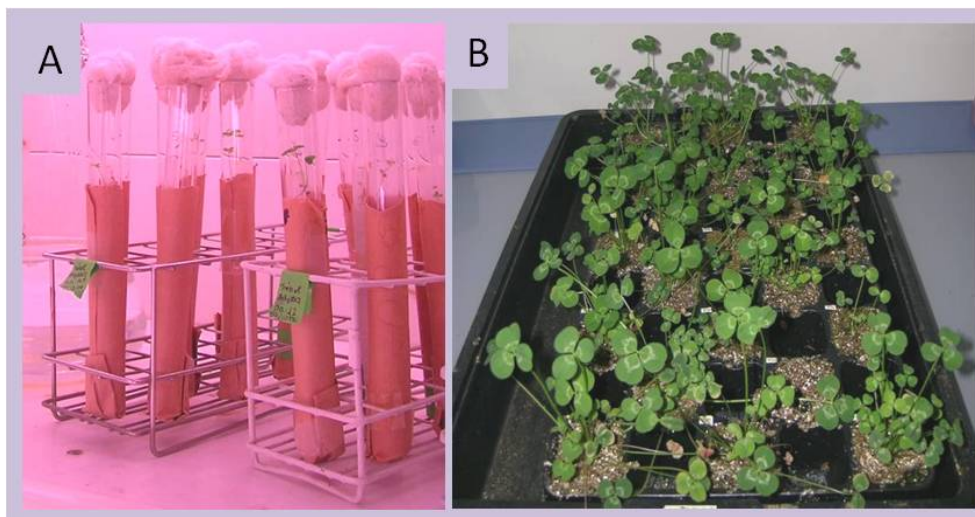


Figura 22. Tipos de cultivos de plantas llevados a cabo en este trabajo según las condiciones descritas. A) Cultivo hidropónico monoxénico en tubo con plantas de trébol en una cámara iluminada. B) Cultivo en invernadero de plantas de trébol sobre alveolos con vermiculita situados en bandejas.

Cada una de las cepas bacterianas fue sembrada en placas de YMA, con sus correspondientes antibióticos en cada caso, y se mantuvieron a 28 °C durante 5 días. Transcurrido este tiempo las células fueron resuspendidas en un volumen de 30 ml de medio líquido Fåhræus modificado. Esta suspensión se utilizó para

añadir 1 ml del inóculo (D.O.₆₀₀: 0,5) a cada tubo, y éstos fueron trasladados a la cámara iluminada tras cubrir las 2/3 partes de la parte inferior de los tubos para dar sombra a las raíces, imitando las condiciones naturales de crecimiento (Figura 22 A). Se utilizaron un mínimo de 12 plantas por experimento y como control negativo se utilizaron plántulas sin inocular. Las plántulas así tratadas se mantuvieron en cámara iluminada tal y como se describe en el apartado 4.4.1 de esta sección durante un máximo de 40 días.

4.5.2. Ensayos de producción vegetal con leguminosas

Con el fin de evaluar el potencial simbiótico real de las distintas cepas de estudio al inocular plantas leguminosas, se llevaron a cabo ensayos en invernadero. Para ello, las semillas estériles germinadas durante 2 días que presentaban raíces rectas se seleccionaron para ser transferidas a macetas con vermiculita estéril como soporte. Tras 48 h cada planta se inoculó con 1 ml de una suspensión bacteriana (DO_{600nm} 0,5; unas 4×10^8 células) en el medio de cultivo correspondiente.

Se utilizaron un mínimo de 28 plantas por experimento repartidas en alveolos cuadrados colocados sobre una bandeja rectangular (Figura 22 B). Las bandejas se regaron con agua destilada cada 2-3 días, según la demanda hídrica, y fueron fertilizadas una vez por semana con 500 ml de solución Fähræus libre de nitrógeno o medio completo Hoagland's nº 2 (1:2) hasta que cumplieron un periodo de tres meses post-inoculación.

4.5.3. Ensayos de tumorigénesis en plantas de tomate y tabaco

Los ensayos relacionados con la capacidad de inducir tumores o causar daños en plantas no leguminosas utilizadas comúnmente en este tipo de determinaciones por parte de algunas de las cepas de estudio fueron llevados a cabo en el Centro Regional de Diagnóstico de la Junta de Castilla y León situado en Aldearrubia (Salamanca). Para ello, plantas cultivadas en las mismas condiciones que en el apartado anterior durante 3-4 semanas de *Lycopersicum esculentum* y *Nicotiana tabacum* fueron inoculadas con cada una de las cepas de estudio por inyección entre los cotiledones y las primeras hojas verdaderas o en las hojas con 1 ml de una suspensión de aproximadamente 10^8 ufc/ml preparada a partir de un cultivo en placa de YMA crecido durante 5 días. Para comprobar un posible efecto en raíces en algunas plantas, se causaron heridas en la parte radicular de algunas plantas, que fueron posteriormente sumergidas en una solución con la misma concentración de inóculo durante 5 min, para posteriormente volver a ser plantadas. Las plantas se mantuvieron en invernadero durante 30 días a 18-25° C. Ninguna de las cepas fue capaz de reproducir ningún signo de virulencia ni patogenicidad en estas plantas tras dichos periodos de tiempo.

4.6. Ensayos post- cultivo

Los siguientes procedimientos fueron llevados a cabo una vez dados por finalizados los ensayos de cultivo de plantas.

4.6.1. Procesado de los nódulos

Las raíces de las plantas fueron lavadas con agua destilada para eliminar los restos de vermiculita en caso de ser necesario y los nódulos que aparecieron en aquellas inoculadas con las distintas cepas de estudio fueron utilizados para realizar las determinaciones que se describen a continuación.

4.6.1.1 Recuento y fotografía

En los ensayos de nodulación en tubo, con el objetivo de realizar ensayos de cinética de nodulación, cada 48 h se llevó a cabo el recuento del número de plantas noduladas y el número de nódulos formados en cada planta, considerando como planta nodulada aquella en la que existe al menos un nódulo visible sobre la raíz.

Por otro lado, al dar por finalizados los ensayos tanto en tubos como en invernadero, se observaron los nódulos directamente con la lupa estereoscópica (Nikon SMZ800) y algunos se fotografiaron con una cámara Nikon Coolpix 5400.

4.6.1.2 Medida del grado de competitividad

Para determinar el grado de competitividad se siguió un método descrito anteriormente utilizando el plásmido pGUS3 (García-Rodríguez y Toro, 2000) según las condiciones descritas anteriormente (van Dillewijn *et al.*, 2001). Para ello, en primer lugar, se llevó a cabo la transformación de la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ANU843 con el plásmido pGUS3 mediante conjugación triparental, y se seleccionaron los transformantes capaces de crecer en medio mínimo suplementado con kanamicina. Posteriormente se sembraron en medio TY que contenía el sustrato cromogénico X-gluc a una concentración final de 40 µg/ml, para comprobar la correcta inserción del plásmido.

Posteriormente se inocularon 28 plantas con 1 ml de una suspensión celular que contenía una mezcla 1:1 de la cepa a estudiar frente a una cepa silvestre marcada con el gen informador *gusA* (pGUS3), ambas a la misma concentración. Como controles, se incluyeron una bandeja con 28 plantas inoculadas con una mezcla 1:1 de la cepa silvestre frente a una cepa marcada y otras 28 plantas sin inocular. Tras la inoculación, las plantas se mantuvieron durante 8 semanas en el invernadero en las condiciones anteriormente señaladas en el apartado 4.5.1. y fueron regadas con medio carente de nitrógeno. Una vez dado por terminado el ensayo, las raíces se cortaron y se dejaron en agua destilada

durante 15 min. A continuación, se sumergieron durante 18 h a 37°C y oscuridad en una solución de revelado con la siguiente composición:

| Solución de revelado (GUS) | Concentración |
|--|---------------|
| Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol- β - glucurónico (X-Gluc) | 1 mM |
| Tampón NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ pH 7 | 50 mM |
| SDS | 1% |

Al día siguiente se realizó el recuento del número de nódulos piriformes aparentemente ocupados que mostraron tinción total o parcialmente azulada en cada una de las muestras, que fueron comparados frente a los nódulos blancos ocupados por la cepa de estudio. El grado de competitividad se calculó como el porcentaje de nódulos parcial o totalmente azules frente a los blancos y se comparó con el del ensayo control para evitar el sesgo derivado de la doble ocupación en los nódulos.

4.6.1.3 Aislamiento de cepas a partir de nódulos de Trifolium.

A partir de los nódulos de algunas plantas se realizó el aislamiento de cepas utilizando el método descrito por Vincent (1970). Los nódulos se sometieron a un tratamiento de desinfección sumergiéndolos en una solución de HgCl₂ al 2,5% durante 2 min. A continuación fueron lavados 5 veces consecutivas con agua destilada estéril para eliminar los residuos de mercurio.

Cada nódulo fue colocado en un microtubo estéril de 1.5 ml y se adicionaron 500 μ L de TY, con ayuda de la misma micropipeta se trituró el nódulo. De la suspensión anterior se tomaron en condiciones asépticas 100 μ L y se colocaron en una placa de YMA que se incubó de forma invertida a 28°C durante 5-7 días.

4.6.1.4 Inclusión, sección y tinción con Azul de Toluidina

Una vez terminados los ensayos de nodulación, se seleccionaron nódulos representativos de cada una de las plantas que fueron fijados con formaldehído (Sigma) al 4% (p/v) para su posterior corte y tinción, que fue llevada a cabo en el Servicio de Patología Diagnóstica/Banco de Tumores del Centro de Investigaciones del Cáncer de la Universidad de Salamanca. Allí, los nódulos fueron sometidos a deshidratación, aplicando una serie gradual de soluciones acuosas de menor a mayor concentración de etanol, seguida de una fase de aclaración con Xilol mediante un procesador Thermo Shandon Excelsior.

A fin de que se pudieran obtener cortes suficientemente finos para ser observados al microscopio, los tejidos fueron incluidos en parafina, que se dejó solidificar a temperatura ambiente. Para ello se utilizó un dispensador Tissue-Tek TEC de Sakura[®]. Posteriormente, fueron fijados en un portamuestras y se realizaron las secciones de 2 μ m de grosor utilizando un microtomo MICROM HM 310.

Los cortes se colocaron sobre portaobjetos a los que se le había agregado una pequeña cantidad de albúmina y la parafina se eliminó mediante un tratamiento con Xilol. La muestra se rehidrató haciéndola pasar por una serie de soluciones con graduaciones decrecientes de alcohol etílico hasta llegar a una solución de agua.

La tinción se realizó aplicando el colorante Azul de Toluidina 0,01% (p/v) (Sigma) manteniendo los tejidos nodulares inmersos durante 1 min. Después se retiró el colorante, se lavó la muestra con agua y se colocó el cubreobjetos fijado con resina. Una vez montadas, las preparaciones se observaron con la lupa estereoscópica y el microscopio óptico y fueron fotografiadas.

4.6.2. **Procesado de las plantas**

4.6.2.1 Medida del peso seco

El peso de las plantas se determinó tras secarlas en un horno a 65°C durante 2 días en papel de filtro para asegurar su completa desecación. Finalmente, las plantas fueron pesadas en una balanza de precisión.

4.6.2.2 Medida del contenido en nitrógeno

La medida del contenido en nitrógeno fue llevada a cabo en un Servicio externo del Instituto de Recursos Naturales de Salamanca (IRNASA-CSIC) según métodos estandarizados por la Asociación Oficial de analistas químicos (A. O. A. C.) (Jonhson, 1990).

5. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

5.1. **Microscopía óptica**

Con el fin de monitorizar los primeros estadios del proceso de infección, tras distintos tiempos post-inoculación las plantas se observaron al microscopio Leica FW4000, tanto en campo claro como en interferencia de fases o luz polarizada. Las muestras de nódulos en fresco o teñidos con Azul de Toluidina también se observaron mediante este microscopio. Las fotografías se tomaron con una cámara Leica acoplada al microscopio.

5.2. **Microscopía de fluorescencia**

Las bacterias teñidas con Calcoflúor se observaron con un microscopio de fluorescencia Zeiss con una excitación de 366 nm.

Para la visualización de los pulsos de calcio se utilizó el microscopio invertido de epifluorescencia Nikon TE2000U (Nikon Instruments Inc., Melville,

NY, USA) acoplado a una cámara digital Hamamatsu Photonics (Hamamatsu Photonics UK Ltd., Welwyn Garden City, UK). La construcción YC2.1 utilizada para medir el “*spiking*” de calcio intracelular en los pelos radicales de *M. truncatula* sirve para hacer una estimación de la cantidad de Ca^{2+} ya que éste se une a la proteína codificada por el gen reportero provocando un cambio en la conformación la proteína fluorescente quimérica de forma que aumenta la eficiencia del FRET. Así, se puede hacer una estimación cuantitativa del ratio YCP: CFP (Wais *et al.*, 2002). Para ello, la muestra fue excitada con una longitud de onda de 437 nm mediante un monocromador Optoscan (Cairn Research, Faversham, Kent, UK). La fluorescencia emitida fue separada por un espejo dicróico y a continuación se hizo pasar a través de un filtro de emisión (Cairn Research) de 485 nm para la fluorescencia de la CFP o de 535 (15 nm) para la de la YFP. Las imágenes fueron recogidas cada 5 sec con un tiempo de exposición de 200–900 msec y analizadas utilizando el software MetaFluor (Universal Imaging Corp., Downington, PA, USA).

5.3. Microscopía confocal

Las bacterias marcadas con proteínas fluorescentes verdes unidas a los pelos radicales y a las partículas de arena se observaron mediante microscopía confocal láser de fluorescencia con un microscopio TSL Leica SP2 o LSM510 de Zeiss aplicando una longitud de onda de excitación de 488-nm mediante el láser de argón y un filtro de emisión de banda ancha centrado en unos 500 nm, permitiendo a su vez, en su caso, la observación de la raíz en rojo al añadir en la solución en la que ésta se encontraba inmersa 10 μM de yoduro de propidio (Sigma). Las proyecciones se llevaron a cabo tomando imágenes individuales cada 1-2 μm y ajustándolas con el software del sistema.

Para la determinación de la fluorescencia emitida debido a la producción de ROS de las plantas sometidas a tinción con 2',7'-diclorodihidrofluoresceindiacetato (DCFDA) se utilizaron las mismas condiciones, ajustando los parámetros a 514 nm de longitud de onda de excitación y un filtro de emisión de banda ancha centrado en unos 535 nm tal y como se describió anteriormente (Leshem *et al.*, 2007).

5.4. Microscopía electrónica

Los ensayos de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y barrido (SEM) se llevaron a cabo en servicios externos de la Michigan State University siguiendo el procedimiento experimental descrito previamente (Mateos *et al.*, 2001). Para ello, las plántulas se recogieron a partir de cultivos *in vitro* y fueron lavadas con medio Fåhræus sin nitrógeno y posteriormente con agua. A continuación, fueron cortadas en segmentos de 5 mm, sumergidas en glutaraldehído al 4% (v/v) durante toda la noche y posteriormente lavadas cuatro veces durante 15 min en tampón cacodilato sódico (pH 7,2). Como siguiente paso

para completar su fijación, los segmentos fueron sumergidos durante 3 h en una solución con OsO₄ al 1% (p/v) preparada en tampón cacodilato sódico a temperatura ambiente, y sometidas a cuatro lavados en tampón cacodilato sódico. Los tratamientos sucesivos variaron en función del tipo de microscopía a realizar.

5.4.1. Microscopía electrónica de transmisión

Tras la fijación de la muestras, estas fueron deshidratadas mediante un gradiente de acetona. Tras varios lavados con acetona al 100%, las muestras fueron infiltradas con concentraciones crecientes de resina Spurr's y polimerizadas a 70°C durante 48h. A continuación, se obtuvieron secciones de 60-90 nm mediante un ultratomo LKB dotado de una cuchilla de diamante y se tiñeron con una solución acuosa de acetato de uranilo y citrato de plomo. Finalmente fueron examinadas con un microscopio electrónico de transmisión Philips CM-10.

5.4.2. Microscopía electrónica de barrido

En el caso de que las muestras fueran a ser visualizadas por microscopía electrónica de barrido, su deshidratación se llevó a cabo mediante una serie de etanol hasta el punto crítico de secado. A continuación fueron recubiertas con OsO₄ en lugar de oro, y finalmente fueron observadas mediante un microscopio de 15 kV modelo JEOL 35 CF.

6. PROGRAMAS INFORMÁTICOS Y BASES DE DATOS

6.1. Edición de plásmidos y diseño de oligonucleótidos

El análisis de las estrategias de clonación y la edición de plásmidos así como el diseño de los oligonucleótidos cebadores se llevaron a cabo utilizando el programa *Clone Manager Suite 6*.

6.2. Análisis de las secuencias de ADN

Para la visualización del cromatograma generado en la secuenciación se utilizó el programa Chromas[®]. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y corregidas manualmente con el programa SeqMan II y EditSeq del paquete informático DNASTAR[®].

6.2.1. Comparación y análisis *in silico* de secuencias

La comparación de secuencias con las registradas en las bases de datos se llevó a cabo con el programa BLAST a través del servidor de Internet del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los programas BLASTN y BLASTP comparan las secuencias, nucleotídicas y proteicas respectivamente, con las depositadas en los banco de genes y nos ofrecen un listado de aquellas que presentan una mayor similitud (Brenner, 1995).

El alineamiento de las secuencias se realizó utilizando el programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) del servidor <http://www.expasy.ch>.

Para el análisis predictivo de la localización del péptido señal se utilizaron los programas SOUSI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0E.html>) y PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp>).

6.2.2. Análisis filogenético

Los árboles filogenéticos se construyeron en base a las secuencias de las cepas de estudio junto con las de las cepas de referencia pertinentes en cada análisis, mediante el programa Mega 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) empleando el método Neighbour-joining (Saitou y Nei, 1987), mediante el coeficiente de Kimura 2 (Kimura, 1980).

6.3. Visualización de imágenes

Los geles de agarosa se visualizaron y fotografiaron utilizando el equipo Gel Doc 2000 equipado con el programa *Quantity One*[®] (Bio-Rad). El resto de imágenes fueron tomadas con una Cámara Lumix y se editaron con el programa Adobe Photoshop[®]. Las imágenes tomadas con el microscopio confocal, fueron superpuestas y editadas con el programa Leica LCS Suite.

6.4. Análisis Estadístico

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de la varianza y se calcularon las mínimas diferencias significativas mediante el test protegido de Fisher LSD (Teel y Torrie, 1985) utilizando el programa StatView[®].

6.5. Gestor bibliográfico

Para la edición de la bibliografía se utilizó el programa EndNote8.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



CAPÍTULO I:

Estudio de la producción de celulasas y celulosa en rhizobia



CAPÍTULO I: ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS Y CELULOSA EN RHIZOBIA

1. PRODUCCIÓN DE CELULASAS

La producción de enzimas que degradan la pared celular vegetal por los rizobios tardó en confirmarse, ya que su síntesis es relativamente baja, no se excretan al medio y requieren técnicas para la detección y cuantificación muy sensibles (*ver capítulo 5.2 de la introducción*). Gracias a la puesta a punto de métodos dotados de mayor sensibilidad (Mateos *et al.*, 1992), en 1995 se detectó la producción de celulasas en los rizobios descritos hasta esa fecha, *Rhizobium leguminosarum* biovariedades trifolii, phaseoli y viciae, *Bradyrhizobium japonicum*, *Mesorhizobium loti* y *Sinorhizobium meliloti* (Jiménez-Zurdo *et al.*, 1996a).

Actualmente, la diversidad conocida de bacterias capaces de establecer simbiosis fijadoras de nitrógeno con leguminosas incluye 13 géneros incluyendo unas 83 especies (Tablas 3-5). Con el objetivo de conocer si la capacidad de producir enzimas hidrolíticos está extendida entre estas bacterias, la mayoría de las cepas tipo oficialmente descritas en el momento de comenzar este estudio dentro de los géneros denominados como “verdaderos rhizobia” y algunos “no-rhizobia” pertenecientes a las α - Proteobacterias e incluidos en los géneros *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum* y *Devosia* capaces de nodular fueron examinados para determinar su actividad celulásica.

1.1. Detección de actividad celulolítica en cepas de microorganismos que nodulan leguminosas

Utilizando la técnica cualitativa de difusión en placas de agar con carboximetilcelulosa como sustrato (Figura 23), se observó que todas las cepas analizadas tienen la capacidad en mayor o menor medida de producir celulasas *in vitro* (Tabla 12). La producción de estas enzimas no fue abundante en ningún caso, pero la gran mayoría de los aislados presentaban un halo visible de hidrólisis de carboximetilcelulosa de 1-5 mm tras 7 días de incubación. La única excepción fueron algunas cepas pertenecientes al género *Bradyrhizobium*, así como *M. chacoense* Pr5^T y *D. neptuniae* J1^T que presentaron halos de hidrólisis débil. Los microorganismos que parecen poseer una mayor capacidad para producir celulasas fueron en general los que se encuentran dentro del género *Rhizobium*, así como las cepas *P. trifolii* PETPO2^T y *A. caulinodans* ORS571^T mientras que los géneros *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium* presentaron unos halos de hidrólisis menores.

Tabla 12. Producción de celulasas en distintas cepas tipo de referencia y representativas de microorganismos que establecen simbiosis con leguminosas y afines. Las especies de rhizobia clásicos están en negrita, el resto son especies de no-rhizobia que son capaces de nodular. *Especies cuya capacidad de nodulación no ha sido descrita. Producción de celulasas: (++) Gran halo de hidrólisis de CMC, (+) presencia de hidrólisis, (w) hidrólisis débil.

| GÉNERO | CEPA | PLANTA HOSPEDADORA | PRODUCCIÓN DE CELULASAS | |
|--|---|--|-------------------------|---|
| Rhizobium | <i>R. cellulosilyticum</i> ALA10B2 ^T | <i>Medicago</i> | ++ | |
| | <i>R. etli</i> CFN 42 ^T | <i>Phaseolus</i> | + | |
| | <i>R. galegae</i> ATCC 43677 ^T | <i>Galega</i> | + | |
| | <i>R. gallicum</i> R602sn ^T | <i>Phaseolus</i> | ++ | |
| | <i>R. giardinii</i> H152 ^T | <i>Phaseolus</i> | + | |
| | <i>R. hainanense</i> I66 ^T | <i>Desmodium</i> | + | |
| | <i>R. huautlense</i> SO2 ^T | <i>Sesbania</i> | + | |
| | <i>R. indigoferae</i> CCBAU 71042 ^T | <i>Indigofera</i> | ++ | |
| | <i>R. leguminosarum</i> ATCC10004 ^T | <i>Pisum</i> | + | |
| | <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> | <i>Trifolium</i> | + | |
| | <i>R. loessense</i> CCBAU 7190B ^T | <i>Astragalus</i> | + | |
| | <i>R. lusitanum</i> P1-7 ^T | <i>Phaseolus</i> | + | |
| | <i>R. mongolense</i> USDA 1844 ^T | <i>Medicago</i> | + | |
| | <i>R. radiobacter</i> ATCC 19358 ^T | * | + | |
| | <i>R. rhizogenes</i> ATCC 11325 ^T | <i>Phaseolus</i> | + | |
| | <i>R. sulae</i> IS123 ^T | <i>Hedysarum</i> | + | |
| | <i>R. rubi</i> ATCC 13335 ^T | * | w | |
| | <i>R. phaseoli</i> ATCC 14482 ^T | <i>Phaseolus</i> | + | |
| | <i>R. pisi</i> DSM 30132 ^T | <i>Pisum</i> | + | |
| | <i>R. tropici</i> CIAT 899 ^T | <i>Phaseolus</i> | + | |
| <i>R. undicola</i> LMG 11875 ^T | <i>Neptunia</i> | ++ | | |
| <i>R. vitis</i> ATCC 49767 ^T | * | ++ | | |
| <i>R. yanglingense</i> CCBAU 71623 | <i>Amphicarpaea</i> | ++ | | |
| Sinorhizobium | <i>S. arboris</i> LMG 14919 ^T | <i>Acacia</i> | + | |
| | <i>S. fredii</i> LMG 6217 ^T | <i>Glycine</i> | + | |
| | <i>S. kostiense</i> LMG 19227 ^T | <i>Acacia</i> | + | |
| | <i>S. meliloti</i> ATCC 9930 ^T | <i>Medicago</i> | + | |
| | <i>S. meliloti</i> 1021 | <i>Medicago</i> | w | |
| | <i>S. medicae</i> LMG1037 ^T | <i>Medicago</i> | + | |
| | <i>S. medicae</i> WSM419 | <i>Medicago</i> | + | |
| | <i>S. morelense</i> Lc04 ^T | * | w | |
| | <i>S. saheli</i> LMG7837 ^T | <i>Acacia</i> | + | |
| | <i>S. terangae</i> LMG6463 ^T | <i>Acacia</i> | + | |
| | <i>S. xinjiangense</i> LMG17930 ^T | <i>Glycine</i> | + | |
| | Mesorhizobium | <i>M. amorphae</i> ACCC 19665 ^T | <i>Amorpha</i> | + |
| | | <i>M. chacoense</i> Pr5 ^T | <i>Prosopis</i> | w |
| | | <i>M. ciceri</i> USDA 3383 ^T | <i>Cicer</i> | + |
| <i>M. huakuii</i> USDA 4779 ^T | | <i>Astragalus</i> | + | |
| <i>M. loti</i> ATCC 33669 ^T | | <i>Lotus</i> | + | |
| <i>M. mediterraneum</i> USDA 3392 ^T | | <i>Cicer</i> | + | |
| <i>M. plurifarium</i> LMG 7836 ^T | | <i>Acacia</i> | + | |
| <i>M. septentrionale</i> HAMB1 2582 ^T | | <i>Astragalus</i> | + | |
| <i>M. tianshanense</i> LMG 18976 ^T | | <i>Sophora</i> | + | |
| <i>M. temperatum</i> HAMB1 2583 ^T | | <i>Astragalus</i> | + | |
| <i>Phyllobacterium</i> | <i>P. trifolii</i> PETPO2 ^T | <i>Trifolium</i> | + | |
| Bradyrhizobium | <i>B. betae</i> pl7Hg ^T | * | - | |
| | <i>B. canariense</i> BTA1 ^T | <i>Chamaecytisus</i> | w | |
| | <i>B. elkanii</i> LMG 6134 ^T | <i>Glycine</i> | + | |
| | <i>B. japonicum</i> LMG 6138 ^T | <i>Glycine</i> | + | |
| | <i>B. liaoningense</i> LMG 18230 ^T | <i>Glycine</i> | w | |
| <i>B. yuanmingense</i> LMG 21827 ^T | <i>Lespedeza</i> | w | | |
| Azorhizobium | <i>A. caulinodans</i> ORS 571 ^T | <i>Sesbania</i> | ++ | |
| Devosia | <i>D. neptuniae</i> J1 ^T | <i>Neptunia</i> | w | |
| Ochrobactrum | <i>O. lupini</i> LUP21 ^T | <i>Lupinus</i> | + | |
| | <i>O. tritici</i> LMG18957 ^T | <i>Cytisus</i> | + | |

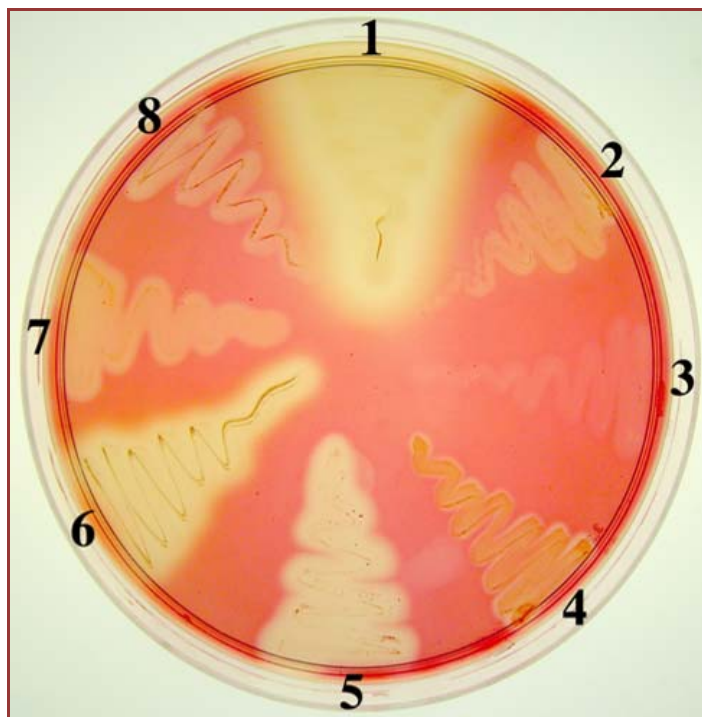


Figura 23. Detección de actividad celulolítica mediante el ensayo en doble capa utilizando carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato en cepas tipo de diferentes géneros de microorganismos que nodulan leguminosas: 1. *Rhizobium undicola* LMG 11875^T (++) , 2. *Rhizobium etli* CFN 42^T (+), 3. *Devosia neptuniae* J1^T (w), 4. *Bradyrhizobium elkanii* LMG 6134^T (+), 5. *Phyllobacterium trifolii* PETPO2^T (++) , 6. *Azorhizobium caulinodans* ORS 571^T (++) , 7. *Mesorhizobium loti* ATCC 33669^T (+). 8. *Sinorhizobium meliloti* ATCC 9930^T (+).

Además, se puede observar como en la mayoría de los casos parece que la actividad enzimática se encuentra unida a las células, ya que los halos de hidrólisis permanecen asociados a las colonias. La capacidad de producir enzimas con actividad celulásica por parte de todos los microorganismos capaces de nodular ensayados, junto con el hecho de que la mayoría lo hagan en pequeña medida, parece apoyar la hipótesis de una implicación de estos enzimas en la simbiosis.

1.2. Aislamiento y caracterización molecular del gen *celC* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843

Una vez observada la capacidad de la celulasa CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* ANU843 para degradar específicamente la pared celular vegetal en el ápice del pelo radical (fenotipo “Hot”) de *Trifolium repens* (Mateos *et al.*, 2001), se decidió profundizar en su análisis y estudio tanto a nivel molecular como *in vivo* para intentar determinar el posible papel que este enzima juega en el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

En primer lugar, para aislar y caracterizar el gen *celC* se siguió una estrategia basada en la genética inversa, la genómica comparativa y el uso de la PCR, apoyándonos en los trabajos previos realizados por el grupo de investigación

“Interacciones planta-microorganismo” del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Tras la purificación de la celulasa CelC2 se obtuvo una secuencia interna de 14 aminoácidos (Ala-Glu-Gly-Phe-Asp-Ala-Glu-Phe-Gly-Tyr-Asn-Ala-Ile-Arg) que sirvió de base para la comparación de secuencias peptídicas deducidas de genes que codifican para las proteínas CelC y para el diseño de oligonucleótidos que amplificaran el gen de interés en *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ANU843, como se describe a continuación.

1.2.1. Clonación y secuenciación

En primer lugar, se realizó una búsqueda de las secuencias de aminoácidos que presentaban homología con la secuencia codificada por el fragmento del péptido interno de la proteína CelC2 en las bases de datos de GenBank y se hizo un alineamiento con las secuencias encontradas con el programa Clustal W1.8. Entre las secuencias deducidas disponibles en las bases de datos cuando se llevó a cabo el estudio (Pérez, 1999), se seleccionó la correspondiente a la proteína CelC de *R. leguminosarum* bv. trifolii R200, ya que presentaba una homología del 85% con la secuencia interna obtenida previamente (Tabla 13).

Tabla 13. Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos en diferentes proteínas CelC homólogas que presentaban una mayor similitud con el fragmento de *R. leguminosarum* bv. trifolii amplificado. Los colores utilizados muestran el grado de alineamiento respecto a la secuencia amplificada, en azul aparecen los residuos que en esa columna son idénticos en todos y en rojo aquellos residuos en los que se han observado sustituciones.

| Especie | Proteína | Nº acceso | Secuencia de aminoácidos |
|------------------------------------|----------|-----------|-----------------------------|
| <i>R. leg. bv. trifolii ANU843</i> | CelC2 | AJ561043 | A E G F D A E F G Y N A I R |
| <i>R. leg. bv. trifolii R200</i> | CelC | AF121340 | A Q G F D A E F A Y N A I R |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | CelC | AAK9008 | A S G F Q P E F G Y N A V R |
| <i>Gluconacetobacter xylinum</i> | CMCax | BAA77583 | A S G W P P R F S Y D A I R |
| <i>Erwinia chrysanthemi</i> | CelY | AAA2481 | A T A W P S R F S Y D A I R |

Asimismo, se identificaron dos regiones probablemente conservadas que flanquean el gen *celC* de la cepa R200 que fueron utilizadas para el diseño de los oligonucleótidos CelCexF y C2R (Figura 24). Con ellos se hizo una PCR utilizando como molde ADN genómico de la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ANU843, obteniendo un fragmento de 1224 pb que fue purificado y clonado en el vector pGEM[®]-T-Easy. La construcción obtenida fue utilizada para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α , que fueron seleccionadas en medio LB con Ampicilina. A los clones resultantes se les extrajo el ADN plasmídico y se comprobaron por digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa; el clon correcto se denominó pPMC2 (Figura 25).

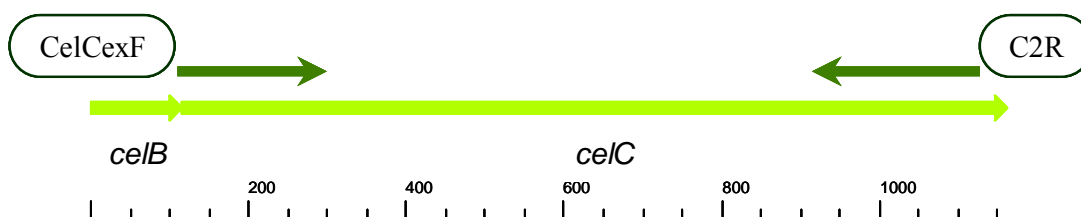


Figura 24. Diseño de los oligonucleótidos CelCexF y C2R para la amplificación del gen *celC2*.

Se realizó un ensayo en placa para la detección de la actividad celulolítica producida por las cepas de *E. coli* DH5 α transformadas con el plásmido pGEM[®]-T-Easy vacío y con el plásmido pPMC2 (Figura 25). Alrededor de la cepa que contenía el vector con el fragmento amplificado con los oligonucleótidos cebadores CelCexF y C2R se observó un halo de hidrólisis que indicaba la presencia de actividad sobre carboximetilcelulosa, a diferencia de la cepa utilizada como control, que no mostró ningún halo. Estos resultados indican que el fragmento clonado en el vector probablemente contenga una copia del gen responsable de la actividad celulásica que es capaz de expresarse y procesarse como una carboximetilcelulasa en otra bacteria gram negativa.

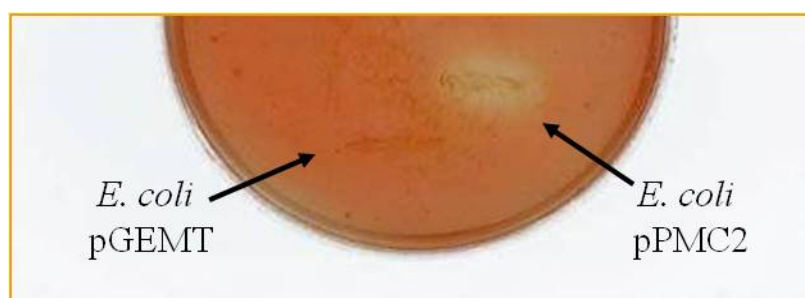


Figura 25. Ensayo de detección de actividad celulolítica en placa de las cepas de *E. coli* transformadas con el plásmido pGEM[®]-T-Easy (*E. coli* pGEMT) vacío y con el plásmido pPMC2 que contiene el fragmento amplificado con los “primers” CelCexF y C2R.

1.2.2. Análisis de la secuencia obtenida

Posteriormente, el fragmento clonado se secuenció utilizando los oligonucleótidos Universal y Reverso. Una vez obtenida la secuencia del fragmento clonado, se procedió al análisis estructural tanto del gen como de la proteína deducida a partir de la secuencia.

El análisis de la secuencia del fragmento de ADN amplificado demostró la existencia de un ORF de 1.044 pares de bases que presentaba un 85% de homología con el gen *celC* de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* R200 y que se denominó *celC2*. Presenta el codón ATG como posible sitio de inicio de la traducción y el codón de terminación

TGA (Figura 26) al final de la secuencia, que fue depositada en el GenBank (número de acceso AJ561043).

1 ATGAGGCGGTGGCGCGCTTCTGCTGGCGGCCTCTGTCGCGGTTGCACCGGGCCTGCCGG
 61 CTACCGCGCAGCAGGCGAT GATTAATGCC GACGCCTGGT CGGCCTACAAGGCGAAGTTT
 121 CTCGATCCGAGCGGCCGCATCGTTGACAACGGCAACGGCAACATCAGCCACAGCGAAGGG
 181 CAGGGCTACGGCCTGCTGCT CGCCTATCTC TCGGCAAGCC CCGCCGATTTTCGAGCAGATC
 241 TGGTATTTTACCCGCACCGAGCTGCTGCTG CGCGACGACGGCCTGGCCGTTTGGAAATGG
 301 GATCCGAACGTCAAGCCGCACGTGGCCGACACCAACAATGCCACCGACGGCGACATGCTG
 361 ATCGCCTATG CTTTGGCGCT TGCCGGCACGGCATGGAAACGTGAAGATTATATCCTCGCT
 421 GCCTCCCGCATGGCGCGGCGCTGCTTGCCGAAACCGTCG GCAGCTCGCAGGGCCGCACC
 481 TTGCTGATGC CGGGAACCGAAGGGTTTACCGGCAGCGACCGCGACGATGGTCCGGTCCGTC
 541 AACCCGTCCTACTGGATTTATGAGGCGATCCCGGTGATGGCAGCGCTCGCGCCGTCGGAT
 601 GCCTGGAAAAAACTGTCGGACGATGGCGTGGAAGTGTGAAGACGATGCAGTTCGGCCCCG
 661 CGCAAGCTTCCCTGCCGAATGGGTGAGCCTGCACGACAAGCCGCGGCCGCGAGAGGGGTTTC
 721 GACGCCGAATTCGGCTACAACGCCATCCGCATCCCGCTATATCTCGCCCCGCGGCGGCATC
 781 ACCGATAAGGCACTGCTCGTCCGCCTGCAAAGGGGATGTCGCAAGACGGCGTTCCCGCC
 841 ACGATCGATCTGACCACCGGCCGCGCCGAAG ACCGTGCTGT CGGACCCCGGTTATCGAATT
 901 GTTAACGATGTTGTGGCCTGTGTTGTCGATGGGACCAGGCTGCCGAGTTCGGCGCTGCAG
 961 TTTGCCCTG CGCTCTATTATCCGTCCACCCTTCAACTGC TGGGGCTGGCCTATATCGGG
 1021 GAGAAGCATCCGGAGTGTCTGTGA

Figura 26. Secuencia nucleotídica del gen *celC2*. En azul aparece el sitio probable del inicio de la traducción y en rojo el codón de parada.

La secuencia del ORF obtenido codifica para una proteína de 347 aminoácidos que contiene la secuencia del péptido aislado de la proteína purificada previamente en nuestro laboratorio (Figura 27). Estos resultados confirman que la secuencia amplificada corresponde con el gen que buscábamos.

TNLSYASLLVVFVLLIGVTTSTMLKKLGRSMRRWRALLLAASVAVAPG
 LPATAQQAMINADAWSAYKAKFLDPSGRIVDNGNGNISHSEGQGYGLLLAYLS
 ASPADFEQIWYFTRTELLLRDDGLAVWKWDPNVKPHVADTNNATDGDMLIAY
 ALALAGTAWKREDYILASRMAQALLAETVGSSQGRTLLMPGTEGFTGSDRD
 DGPVVNPSYWIYEAI PVMAALAPSDAWKKLSDDGVELLKTMQFGPRKLP AEW
 VSLHDKPRPAEGFDAEFGYN AIRIPLYLARGGITDKALLVRLQKGMSQDGVPAT
 IDLTTGRPKTVLSDPGYRIVNDVVACVVDGTRLPSSALQFAPAL YYPSTLQLLG
 LAYIGEKGHPECL

Figura 27. Análisis *in silico* de la secuencia de 347 aminoácidos codificada por el ORF obtenido mediante amplificación por PCR de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ANU843 usando los “primers” CelCexF y C2R. La secuencia final de la proteína CelB se encuentra subrayada. La secuencia de aminoácidos correspondiente al péptido señal se encuentra señalada en color azul. En verde se muestra el correspondiente al dominio de las GH8 y en rojo la secuencia consenso del centro catalítico.

La búsqueda de dominios conservados en las bases de datos con el programa BLASTP confirmó la presencia de un dominio catalítico GH8 cuyo alineamiento se produce en la región que abarca los aminoácidos 38-287 (Figura 27, color verde). Este dominio corresponde al de la familia 8 de las glicosil hidrolasas, que engloba unas 60 proteínas presentes únicamente en bacterias. Las GH presentan la capacidad de hidrolizar el enlace glicosídico entre dos o más carbohidratos o entre un carbohidrato y un residuo de otra naturaleza. Dentro de este grupo, las GH8 comprenden enzimas con diferentes actividades entre las que se encuentra la actividad endoglucanasa (EC 3.2.1.4). Estos datos concuerdan con los obtenidos durante la caracterización bioquímica de la celulasa CelC2, donde se encontró que se trataba de una 1,4- β -D-endoglucanasa (*ver apartado 5.4 de la introducción*).

El dominio de las glicosil hidrolasas de la familia 8 presenta una secuencia consenso para el centro catalítico de estas enzimas. El alineamiento de la secuencia obtenida para la celulasa CelC2 con dicha secuencia consenso predice una región que abarca los aminoácidos 114-132 (Figura 27, color rojo). La única proteína perteneciente a la familia 8 de las glicosil hidrolasas de la que se obtiene la estructura cristalina (pfam01270) se trata de una endoglucanasa de *Clostridium thermocellum* (Alzari *et al.*, 1996). Según el modelo propuesto por estos autores, las proteínas pertenecientes a esta familia se pliegan en forma alfa/alfa por medio de 6 barriles compuestos por seis hélices alfa internas y seis externas (Figura 28). Así, los sustratos oligosacáridicos se unen a una hendidura que contiene al menos cinco sitios de unión a enlaces D-glucósido y el residuo Glu95, estrictamente conservado, ocupando el centro del sitio de unión a sustrato y al que se le ha asignado la función catalítica.



Figura 28. Estructura cristalina de una endoglucanasa de *Clostridium thermocellum* perteneciente a la familia 8 de las glicosil hidrolasas, formando un complejo catalítico con un sustrato.

En un análisis más exhaustivo de la secuencia obtenida, el programa SOUSI predijo la existencia de un péptido señal de 23 aminoácidos al comienzo de la secuencia (Figura 27, azul). Este péptido señal contiene tres regiones comunes que comparten las proteínas de membrana que son transportadas mediante el sistema de secreción general (Sec) en bacterias Gram negativas. Estas regiones incluyen una sección N-terminal, una

sección h que codifica una región hidrofóbica con estructura hélice α y un dominio c que contiene el sitio de corte de la peptidasa. Según el programa PSORT, el péptido señal completo abarca los aminoácidos (1-30) y predice la posible localización de la proteína CelC2 en la membrana externa de la célula. Estos resultados obtenidos mediante el análisis *in silico* de la proteína refuerzan los datos experimentales que previamente había obtenido nuestro grupo de investigación sobre la localización subcelular del enzima CelC2 (*ver apartado 5.3 de la introducción*).

La actividad celulásica correspondiente a esta proteína se detectó en extractos celulares lavados y sometidos a un tratamiento con lisozima-EDTA o a sonicación, pero nunca en el medio extracelular de cultivo (Jiménez-Zurdo *et al.*, 1996a). Por otro lado, utilizando tanto microscopía electrónica de transmisión como de barrido, se observó la aparición de unas zonas de erosión denominadas “pits” que correspondían *in situ* con el contorno de cada bacteria individual adherida a las raíces de la epidermis de las paredes celulares de trébol (Figura 14 C), sugiriendo que la actividad hidrolasa asociada a esa degradación se encontraba muy localizada.

Por tanto, la proteína CelC2 es excretada al espacio periplásmico de la bacteria y una vez allí, permanece adherida a la membrana externa desde la que llevará a cabo su función localizada. Este hecho también concuerda con su posible implicación en el proceso de interacción simbiótica planta-microorganismo, ya que una producción extracelular de enzimas celulolíticos por parte de la bacteria podría desencadenar la respuesta defensiva de la planta. Esta reacción suele producirse cuando la planta detecta la presencia de microorganismos fitopatógenos, en los que las endo- 1,4 β -glucanasas y en general los enzimas hidrolíticos de la pared celular vegetal son, en la mayoría de los casos, extracelulares y, por tanto, abundantes en los sobrenadantes de cultivo (Rapp y Beermann, 1991).

1.3. Análisis filogenético del gen *celC*

La comparación de la secuencia aminoacídica de la proteína codificada por el gen *celC2* con otras secuencias depositadas en bases de datos con el programa BLASTP mostró que presenta homología con otras celulasas de diferentes especies bacterianas como CelC de *Agrobacterium tumefaciens* (Matthysse *et al.*, 1995), CMCax de *Gluconacetobacter xylinum* (Wong *et al.*, 1990), CelY de *Erwinia chrysanthemi* (Guisseppi *et al.*, 1991), Cuda de *Cellulomonas uda* (Nakamura *et al.*, 1986) y BcsZ de *Escherichia coli* K12 (Park y Yun, 1999), todas pertenecientes a la familia 8 de las glicosil hidrolasas (Coutinho y Henrissat, 1999).

El gen *celC* se encuentra ampliamente distribuido y relativamente conservado dentro de los microorganismos capaces de nodular ya que presenta por ejemplo un 97% y un 86% de identidad con los genes Rleg21206 y Rleg1295 contenidas en los genomas recién secuenciados de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii WSM2304 y WSM1325 respectivamente (GenBank CP001191.1 y CP001622.1) (aún sin publicar), un 88% de identidad con el gen *cel8A* de *R. leguminosarum* bv. trifolii 1536 (GenBank AY227046) (An *et al.*, 2004), un 86% con *celC* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (GenBank AM236080) (Young *et al.*, 2006), un 85% con el gen RHE_CH01544 de *R. etli* CFN42 (GenBank CP000133) (González *et al.*, 2006), un 69% con *Smed_5210* de *Sinorhizobium medicae* WSM419 (GenBank CP000740) (aún sin publicar) y un 68%

con NGRb15380 de *Rhizobium* sp. NGR234 (GenBank YP002823742) (Schmeisser *et al.*, 2009).

Inicialmente, este gen fue secuenciado en diferentes cepas de *Rhizobium* con capacidad para nodular trébol. En la actualidad, existen algunos problemas con su nomenclatura derivados de la asignación de nombres diferentes en cada cepa: así, pasó a denominarse *celC* cuando el operón completo fue secuenciado en *R. leguminosarum* bv. trifolii R201 (Ausmees *et al.*, 1999), pero también ha sido nombrado *celC8A* debido a que codifica una proteína de la familia 8 de las glicosil hidrolasas en *E. coli* (An *et al.*, 2004), y *celY* en *R. leguminosarum* bv. viciae 3841 (Young *et al.*, 2006) debido a que codifica una 1,4- β -endoglucanasa Y en *Erwinia chrysanthemi* (Guiseppe *et al.*, 1991). Por otro lado, en nuestro grupo de investigación comenzamos asignándole el nombre *celC2* porque codifica para una celulasa a la que se había denominado C2 (Mateos *et al.*, 1992) para distinguirla de otra celulasa de mayor tamaño localizada mediante zimograma en *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843.

Sin embargo, pensamos que el nombre correcto es *celC* porque es la nomenclatura utilizada en la mayoría de los genomas completos de microorganismos afines secuenciados hasta la fecha, como *Agrobacterium tumefaciens* (actualmente *Rhizobium radiobacter*) C58 cuyo genoma fue el primero secuenciado por completo de este grupo de bacterias (Goodner *et al.*, 2001). Más tarde, el gen *celC* ha sido localizado en varias cepas del género *Rhizobium* cuyas secuencias completas se han obtenido recientemente, tales como *R. etli* (González *et al.*, 2006), *R. radiobacter* K84 (Slater *et al.*, 2009), recientemente reclasificada como *R. rhizogenes* (Velázquez *et al.*, 2010) y *Rhizobium* sp. NGR234 (Schmeisser *et al.*, 2009). Por otra parte, en las anotaciones del genoma completo de *R. leguminosarum* bv. viciae 3841 el nombre inicial *celY* se ha cambiado a *celC* (Young *et al.*, 2006). Por tanto, se utilizará esa nomenclatura en esta memoria a partir de ahora aunque, para diferenciarlo de la endoglucanasa C1 localizada por zimograma en *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843, se seguirá denominado CelC2 a la proteína codificada por el gen *celC* en esta cepa.

En todas las cepas en las que el gen *celC* ha sido localizado hasta ahora, éste se encuentra en el cromosoma, excepto en *Rhizobium* sp. NGR234, cuyo nombre correcto es *Sinorhizobium* sp. (Jarvis *et al.*, 1992) y *Sinorhizobium medicae* WSM419 en las que se encuentra en un plásmido (Schmeisser *et al.*, 2009). Homólogos a este gen no han sido localizados en ninguna de las tres cepas del género *Bradyrhizobium* secuenciadas hasta la fecha (Giraud *et al.*, 2007; Kaneko *et al.*, 2002), ni en *Azorhizobium caulinodans* (Lee *et al.*, 2008), ni en *Mesorhizobium loti* ni *Rhizobium* (antes *Agrobacterium*) *vitis* S4 (Slater *et al.*, 2009). En el caso del género *Sinorhizobium*, el gen *celC* no se encontró en la cepa *S. meliloti* 1021 (Galibert *et al.*, 2001), pero sí en la cepa *S. medicae* WSM419. La caracterización funcional de este gen se describe en apartados posteriores de esta memoria. Por otro lado, el gen *celC* de *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843 se encuentra en una región del cromosoma denominada *celABC* que participa en la biosíntesis de celulosa (Ausmees *et al.*, 1999). El análisis de este operón así como de la capacidad de llevar a cabo la biosíntesis de celulosa por parte de los rizobios se tratará ampliamente en el siguiente apartado.

La búsqueda de genes que codifican enzimas con actividad celulasa en los genomas de los rizobios de los que se dispone su secuencia en la actualidad mediante el programa BLASTP, reveló la existencia de posibles glicosil hidrolasas pertenecientes a la familia GH8 (como la celulasa CelC) o a las familias GH26 y GH5 (Tabla 14). Según estos resultados, se confirma la existencia de otras celulasas en todos los rizobia

secuenciados, aunque pertenecientes a diferentes familias. También se ha encontrado Glicosil hidrolasas de la familia 8 en otros microorganismos considerados no-rhizobia como *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 (Mnod_3739), o en otros simbiontes diazotrofos como *Azotobacter vinelandii* DJ (CP001157.1).

Tabla 14. Genes que codifican celulasas en Rhizobia. Datos de GenBank

| Rhizobia | Localizador | Familia Glicosil Hidrolasa |
|---|--|----------------------------|
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM1325 | Rleg_1295 Rleg_4334 | GH 8 GH 26 |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM2304 | Rleg2_1206 Rleg2_4005 | GH 8 GH 26 |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> 3841 | RL_1648 RL_0081 | GH 8 GH 26 |
| <i>Rhizobium etli</i> CFN42 ^T | RHE_CH01544 RHE_CH00072 | GH 8 GH 26 |
| <i>Rhizobium etli</i> CIAT 652 | RHECIAT_CH0001612 RHECIAT_CH0000076 | GH 8 GH 26 |
| <i>Rhizobium</i> sp. NGR234 | NGRb_15362 NGRb_17880 | GH 8 GH 26 |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 | ATU_3307 ATU_3312 | GH 8 GH 26 |
| <i>Agrobacterium radiobacter</i> K84 | Arad_7618 | GH 26 |
| <i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419 | Smed_5210 Smed_3669 | GH 8 GH 26 |
| <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 | SMb_20462 | GH 26 |
| <i>Mesorhizobium loti</i> MAFF33099 | Mll_7872 mlr3893 | GH 26 GH 5 |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110 | blr_3367 | GH 5 |
| <i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS 571 | AZC_1301 | GH 5 |

Estos datos indican que los genes que codifican enzimas con actividad celulolítica están comúnmente extendidos y son expresados entre una gran diversidad de las eubacterias de vida libre que establecen relaciones con las plantas. En caso de confirmarse su implicación en el proceso de infección, este hallazgo podría reflejar una evolución común de las estrategias simbióticas compartida por la bacteria y su leguminosa hospedadora.

1.3.1. Secuenciación del gen *celC* en especies del género *Rhizobium*

Como ya se ha comentado anteriormente, los genes que codifican enzimas con actividad celulolítica están muy extendidos entre una gran diversidad de bacterias que establecen relaciones con plantas, incluyendo a las especies simbióticas y patógenas del género *Rhizobium*. De entre estos genes, uno de los más estudiados y que ha sido secuenciado en otras especies es el gen *celC*, que además parece jugar un papel importante en la simbiosis. Por ello, a continuación se decidió llevar a cabo la

amplificación y secuenciación de este gen en varias especies del género *Rhizobium* aisladas a partir nódulos de diferentes leguminosas así como de diferentes tipos de hipertrofias en plantas para analizar su grado de conservación y comparar la filogenia de este gen con las obtenidas a partir de otros genes cromosómicos y simbióticos de las especies de este grupo.

El análisis del gen *celC* se realizó en cepas tipo y silvestres de diferentes especies del género *Rhizobium* pertenecientes a distintos grupos filogenéticos de acuerdo con el gen ribosómico 16S, que fueron aisladas en distintos lugares geográficos y procedentes de nódulos de una amplia variedad de leguminosas. También se incluyeron en este trabajo aislados representativos de diferentes biovariedades pertenecientes a una misma especie, como de las biovariedades trifolii, viciae y phaseoli de *R. leguminosarum*, las biovariedades gallicum y phaseoli de *R. gallicum* y las biovariedades phaseoli y mimosae de *R. etli* (Tabla 15).

Tabla 15. Cepas tipo y aislados representativos de diferentes biovariedades del género *Rhizobium* en los cuales fue amplificado y secuenciado el gen *celC* en este estudio.

| CEPAS TIPO | CEPAS REPRESENTATIVAS DE BV. |
|---|---|
| <i>R. pisi</i> DSM 30132 ^T | <i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii ATCC 14480 |
| <i>R. gallicum</i> R602sp ^T | |
| <i>R. giardinii</i> H152 ^T | <i>R. leguminosarum</i> bv. viciae RVS03 |
| <i>R. hainanense</i> I66 ^T | <i>R. leguminosarum</i> bv. phaseoli RPVF18 |
| <i>R. phaseoli</i> ATCC 14482 ^T | <i>R. sp.</i> bv. phaseoli RPVR32 |
| <i>R. tropici</i> CIAT 899 ^T | <i>R. etli</i> bv. mimosae Mim-2 |
| <i>R. rhizogenes</i> ATCC 11325 ^T | <i>R. sp.</i> bv. trifolii RTP05 |
| <i>R. indigoferae</i> CCBAU 71042 ^T | <i>R. sp.</i> bv. viciae CVIII14 |
| <i>R. mongolense</i> USDA 1844 ^T | <i>R. gallicum</i> bv. phaseoli PhD12 |
| <i>R. leguminosarum</i> bv. viciae USDA 2370 ^T | <i>R. tropici</i> Br859 |
| <i>R. tibeticum</i> CCBAU85039 ^T | <i>R. rhizogenes</i> 163C |
| <i>R. alamii</i> GBV016 ^T | <i>R. rhizogenes</i> K84 |
| <i>R. fabae</i> 23997 ^T | <i>R. giardini</i> RPA12 |

En todas estas cepas, fue amplificado y secuenciado un fragmento de aproximadamente 800 pares de bases del gen *celC* utilizando los cebadores C1F-C2R y ADN genómico de las distintas especies de estudio como molde. Posteriormente, se comprobó que las secuencias obtenidas correspondían al gen *celC* por comparación con las secuencias depositadas en las bases de datos públicas. Además, en este trabajo fueron diseñados otros cebadores a partir de alineamientos de zonas conservadas del gen *celC* disponibles en bancos de datos y las secuencias que se fueron obteniendo, con el objetivo de ampliar el número de especies que abarcaba este estudio (*ver apartado de materiales y métodos*).

Sin embargo, ni utilizando los “primers” C1F-C2R, ni otros cebadores diseñados pudo obtenerse la secuencia del gen *celC* bajo las condiciones de estudio en las otras especies de rhizobia y no-rhizobia que nodulan leguminosas pertenecientes a distintos géneros recogidos en la tabla 10 (Figura 29). Esto puede deberse a que, pese a que en

otras especies y géneros también existan ortólogos al *celC* o genes que codifican celulasas de la familia GH8, la divergencia en las secuencias hace que haya cambios nucleotídicos que impiden que los cebadores diseñados puedan anillar en las regiones correspondientes a este gen.

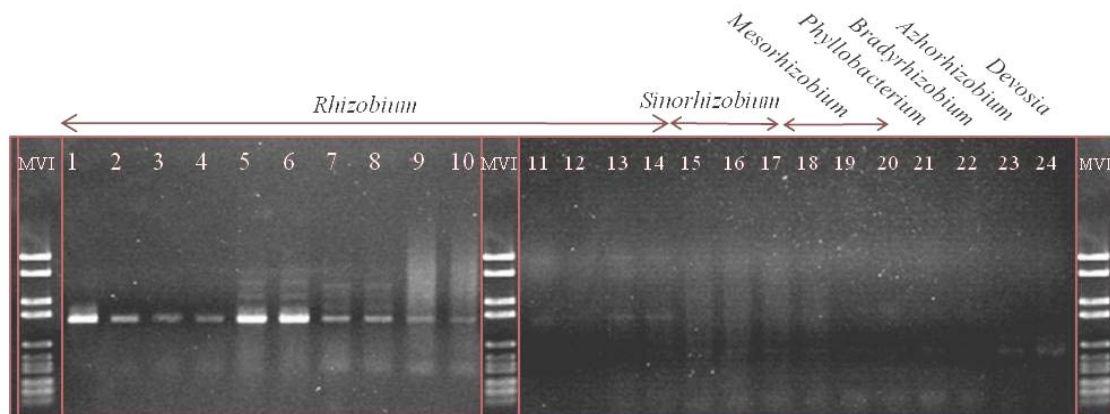


Figura 29. Amplificación por PCR del gen *celC* mediante los cebadores C1F-C2R (1044 pb) en distintas especies de microorganismos que nodulan leguminosas: 1. *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ANU843; 2. *Rhizobium gallicum* R602sp^T; 3. *Rhizobium phaseoli* ATCC 14482^T; 4. *Rhizobium pisi* DSM 30132^T; 5-6. *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ATCC 14480; 7-8. *Rhizobium tropici* CIAT 899^T; 9-10. *Rhizobium hainanense* I66^T. 11. *R. galegae* ATCC 43677^T; 12. *R. lusitanum* P1-7^T; 13-14. *R. loessense* CCBAU7190B^T; 15. *S. kostiense* LMG 19227^T; 16. *S. sahelii* LMG7837^T; 17. *S. medicae* LMG1037^T; 18. *M. chacoense* Pr5^T; 19. *M. ciceri* USDA 3383^T; 20. *M. temperatum* HAMB1 2583^T; 21. *P. trifolii* PETPO2^T; 22. *B. elkanii* LMG 6134^T; 23. *A. caulinodans* ORS 571^T; 24. *D. neptuniae* J1^T. MVI: marcador de peso molecular cuyos tamaños de banda son 2176, 1760, 1230, 1033, 653, 517, 453 y 394 pb. En las especies correspondientes a los carriles 11-24 no se pudo secuenciar el gen *celC* por presentar una amplificación muy débil o ausencia de ésta.

Las secuencias de los fragmentos obtenidos del gen *celC* fueron depositadas en las bases de datos y, junto con las secuencias previamente publicadas de este gen en miembros de la familia *Rhizobiaceae* disponibles en GenBank, se realizaron las tablas de porcentajes de identidad entre este gen en las distintas cepas (Tabla 16) y el árbol filogenético correspondiente (Figura 30).

Las cepas tipo de las especies del género *Rhizobium* analizadas fueron claramente distintas entre ellas en función del gen *celC* formando ramas bien diferenciadas en el árbol filogenético, lo que indica que este gen permite diferenciar las especies del género *Rhizobium*. En general, los grupos formados tras el análisis del gen *celC* son congruentes con los formados tras el análisis de los genes ribosómicos 16S y los genes “housekeeping” *recA* y *atpD*. Así por ejemplo, las especies *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. phaseoli*, *R. indigofeare*, *R. fabae* y *R. pisi* formaron un grupo compacto con porcentajes de similitud superiores al 84%.

Cabe destacar que la cepa ATCC 14480, previamente denominada *R. trifolii*, se encuentra estrechamente relacionada con *R. leguminosarum* USDA 2370^T (valores de identidad superiores al 98%), según la filogenia del gen *celC*. Estos datos concuerdan con los resultados que se han obtenido con anterioridad en nuestro grupo de investigación en base al análisis de la secuencia de los genes *recA* y *atpD* (Ramírez-Bahena *et al.*, 2008). Este grupo también incluye varias cepas aisladas de distintos hospedadores como *Trifolium*, *Vicia* y *Phaseolus* que pertenecen a diferentes

biovariedades de acuerdo a los resultados obtenidos tras el análisis taxonómico del gen *nodC* (Álvarez-Martínez *et al.*, 2009; García-Fraile *et al.*, 2010).

En este análisis también se incluyeron todas las cepas de *Rhizobium* en las que se han secuenciado homólogos al gen *celC* y también aquellas en las que se ha localizado este gen y cuyos genomas están completamente secuenciados. Algunas de estas cepas fueron aisladas a partir de nódulos de *Trifolium* o *Vicia* y forman un clúster con porcentajes de identidad altos que oscilan entre el 98,7%, entre las cepas *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ATCC 14480 y *R. leguminosarum* bv. *viciae* USDA 2370^T, y el 92,4% entre las cepas *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM1325 y *R. leguminosarum* bv. *viciae* USDA 2370^T. Sin embargo, otras cepas actualmente incluidas en *R. leguminosarum* y cuyos genomas están secuenciados por completo (3481, WSM2304, WSM1325) presentaron valores de identidad bajos (inferiores al 91%). Por tanto, sería necesario revisar el estatus taxonómico de estas cepas.

Otro agrupamiento interesante dentro de este primer grupo, es el de las cepas de *R. etli* CIAT 652 y *R. etli* bv. *mimosae* Mim-2, que mostraron solamente un 87,8 y un 86,5% de identidad con respecto a la cepa tipo de la misma especie (CFN42^T) y, por otro lado, una secuencia del gen *celC* casi idéntica a la de *R. phaseoli* ATCC 14482^T. Por tanto, es posible que las cepas CIAT 652 y Mim-2 pertenezcan a *R. phaseoli* y no a *R. etli*.

También se puede observar que el gen *celC* de nuestra cepa de estudio *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 se localiza dentro de este primer grupo, relacionada con otras especies capaces de nodular trébol como la cepa WSM2304 con la que comparte la mayor identidad (97%). Respecto a las cepas tipo, nuestra cepa de estudio mostró un porcentaje de similitud del gen *celC* del 88% con respecto a la cepa *R. leguminosarum* bv. *viciae* USDA 2370^T, del 86% respecto a la cepa tipo de *R. pisi*, del 85,5% respecto a la cepa tipo de *R. phaseoli* y del 84% con respecto a la cepa tipo de *R. etli*. Curiosamente, entre las secuencias del gen *celC* de cepas representativas de diferentes biovariedades, la cepa ANU843 presentó una mayor identidad con aquellas pertenecientes a la biovariedad *phaseoli* como RPVR32 (95,5%), seguida de la cepa RPVF18 (88,2%).

Un segundo grupo estaría formado por las especies *R. mongolense* y *R. gallicum* cuyas cepas tipo presentaron 95,8% de identidad en el gen *celC*. El tercer grupo está formado por cepas pertenecientes a las especies *R. hainanense* y *R. tropici*, todas ellas con capacidad de nodular, y *R. rhizogenes*, que incluye cepas que inducen tumores o raíces adventicias en plantas y que anteriormente estaban incluidas dentro del género *Agrobacterium*. Las cepas de *R. hainanense* y *R. tropici* forman ramas independientes con valores de identidad bajos entre ellas (inferiores al 82%). Sin embargo, la rama de las cepas K84, 163C y ATCC 11325^T pertenecientes a la especie *R. radiobacter*, usadas como biocontrol y formadoras de tumores y raíces adventicias respectivamente, presentaron secuencias del gen *celC* internas prácticamente idénticas. En este caso los resultados del análisis *celC* concuerdan con la reciente reclasificación de la cepa K84 en la especie *R. rhizogenes* (Velázquez *et al.*, 2010). Las altas identidades encontradas muestran que el gen *celC* no está relacionado con el tipo de síntoma provocado en la planta.

La cepa NGR234 se agrupa con *S. medicae* WSM419 y curiosamente en ambos genomas el gen *celC* ha sido localizado en plásmidos simbióticos, en contraste con la localización en el resto de las especies del género *Rhizobium*, donde se ha identificado

en el cromosoma. No obstante, aunque la cepa NGR234 se denomina *Rhizobium* sp., varios autores (Jarvis *et al.*, 1992) ya demostraron que filogenéticamente es cercana a *Sinorhizobium fredii* y que probablemente su clasificación ha sido errónea, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la filogenia del gen *celC*.

Para analizar la adecuación del gen *celC* como marcador taxonómico, se comparó con los resultados del análisis de tres genes comúnmente utilizados para la clasificación e identificación de las especies de rizobios por su alto grado de conservación (16S, *recA*, *atpD*) y de un gen marcador relacionado con la simbiosis (*nodC*), que en el caso del género *Rhizobium* está codificado en plásmidos.

1.3.2. Análisis filogenético comparativo con el gen que codifica para el ARN ribosómico 16S

La actual clasificación filogenética de las bacterias se basa en las secuencias del ADN ribosómico 16S (Olsen *et al.*, 1986; Woese *et al.*, 1984; Woese, 1987), de aproximadamente 1500 nucleótidos, que contiene regiones conservadas que permiten el estudio de las relaciones entre taxones distantes y regiones muy variables que se utilizan en la diferenciación de géneros y especies (Ludwig y Schleifer, 1994; Stackebrandt *et al.*, 2002). Este fue el primer gen utilizado en el estudio comparativo con la filogenia del gen *celC*, ya que además es el gen comúnmente usado para la clasificación de los rizobia (Kuykendall, 2005). En este trabajo también llevamos a cabo la secuenciación del 16S de nuestra cepa de estudio *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843 para incluirla en estos análisis. Los resultados del análisis filogenético se muestran más adelante (Figura 31 y tabla 17).

Estos resultados básicamente concuerdan con los obtenidos con el gen *celC*, sin embargo, deben hacerse algunas consideraciones. Por ejemplo, el gen 16S no resulta suficientemente resolutivo para diferenciar algunas especies, como ocurre en el caso de *R. phaseoli*, *R. etli* y *R. pisi*, cuyo gen ribosómico 16S presenta una identidad cercana al 100% entre ellos, como se ha analizado recientemente (Ramírez-Bahena *et al.*, 2009). Sin embargo, existen otros genes cromosómicos conservados en el genoma de los rizobios conocidos como “housekeeping”, como los genes *atpD* y *recA* cuyas secuencias serán analizadas a continuación, que sí muestran diferencias entre aislados de estas especies. Como se demostró en el apartado anterior, el gen *celC* fue capaz de diferenciar estas tres especies (Figura 30), por lo tanto podría ser útil como marcador filogenético auxiliar para la diferenciación de las especies del género *Rhizobium* que poseen secuencias del gen 16S estrechamente relacionadas. Ejemplos similares fueron encontrados en el resto de las especies analizadas en este estudio, cuya diferenciación en base al gen *celC* fue mayor que cuando se utilizó el gen 16S.

En cuanto a las cepas cuyo genoma ha sido completamente secuenciado, los resultados del análisis del ARN ribosómico 16S también confirman los obtenidos en el caso del gen *celC*. Por ejemplo, *R. etli* CIAT 652 presentan genes ribosómicos 16S idénticos a *R. phaseoli* ATCC 14482^T por lo que su clasificación no es correcta. Con respecto a la cepa de *Rhizobium* sp. NGR234, el análisis del gen 16S confirma que pertenece al género *Sinorhizobium*, y que quizá sea una nueva especie cercana a *S. medicae* WSM419 (98,6%) que con las especies del género *Rhizobium* más cercanas como *R. tropici* Br859 (95,5%) y *R. giardinii* H152^T (96,3%).

La secuencia del gen ribosómico 16S de la cepa ANU843 presentó un porcentaje de similitud del 99,9% respecto a las cepas *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii WSM1325, y también respecto a *R. leguminosarum* bv. viciae 3841 y a la cepa ATCC 14480, previamente denominada *Rhizobium trifolii*. Si analizamos la semejanza respecto a las cepas tipo, ANU843 presenta un porcentaje de similitud mayor con la cepa *R. leguminosarum* bv. viciae USDA 2370^T (99,7%) lo que parece indicar que efectivamente pertenece a la especie *R. leguminosarum*. Las siguientes especies en proximidad filogenética fueron *Rhizobium pisi* DSM 30132^T y *Rhizobium phaseoli* ATCC 14482^T, con porcentajes de similitud del 99,3% y 99,2% respectivamente. Hay que señalar que entre las secuencias de las cepas tipo de estas tres especies los porcentajes de similitud son muy altos, oscilando entre el 99,1% y el 99,8%, por lo que es necesario realizar estudios adicionales para asegurar si la cepa ANU843 ha sido correctamente clasificada como *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii.

Estos resultados muestran claramente que el gen 16S no es la mejor herramienta para la delimitación de especies dentro del género *Rhizobium*, un hecho que ya han puesto de manifiesto anteriormente otros autores (Ramírez-Bahena *et al.*, 2008; Valverde *et al.*, 2006). Por ello, pensamos que es necesario incluir en este análisis otros genes para este objetivo ya que, además, un solo gen no puede reflejar la evolución de todo el genoma de una bacteria. Dentro de los marcadores filogenéticos con una tasa evolutiva más alta que el gen ribosómico 16S, los genes *recA* y *atpD* son los más adecuados ya, además de su grado de conservación, han sido previamente secuenciados en muchas especies de diferentes grupos de rizobios (Gaunt *et al.*, 2001). Aunque aún no existen estudios sistemáticos sobre los valores de identidad de ambos genes en diferentes especies del género *Rhizobium*, en nuestro grupo de investigación se ha descrito que los valores de identidad de alrededor del 95% parecen estar relacionados con resultados del análisis de hibridación ADN-ADN inferiores al 70%, valor umbral para la diferenciación de especies en procariontes (Wayne *et al.*, 1987).

1.3.3. Análisis filogenético comparativo con los genes *recA* y *atpD*

Los conocidos como “*housekeeping*”, son genes que codifican para proteínas con funciones esenciales dentro del metabolismo de la célula y, por tanto, necesarios para su supervivencia. Por ello, estos genes poseen un grado de conservación y mantenimiento de la información genética que permite utilizarlos como marcadores complementarios al gen 16S, pese a que la divergencia de su secuencia sea mayor. Dentro de los distintos “*housekeeping*” utilizados en taxonomía de rizobia, en este estudio se analizaron los genes *recA* y *atpD*, ya que poseen las ventajas de presentar una única copia y localizarse en sitios diferentes en el genoma y estar omnipresentes en los seres vivos, lo que permite reflejar su evolución de una forma global.

El gen *recA* codifica una recombinasa que actúa en el sistema de reparación de ADN. En los últimos años, numerosos estudios filogenéticos realizados tanto en otros grupos de bacterias (*Frankia*, *Acidothermus*, *Vibrio*, *Burkholderia*, *Streptococcus*...) como en rizobia, muestran compatibilidad entre este gen y el análisis obtenido mediante las secuencias del gen ribosómico 16S (Costechareyre *et al.*, 2010; Eisen, 1995; Lloyd y Sharp, 1993; Marechal *et al.*, 2000; Menna *et al.*, 2009; Pascual *et al.*, 2010; Payne *et al.*, 2005; Pombert *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2007; Rossi *et al.*,

2006; Santillana *et al.*, 2008; Scholz *et al.*, 2008; Sepe *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2004; Weng *et al.*, 2009).

Por su parte, el gen *atpD* codifica para la subunidad β de la proteína ATP-sintetasa de membrana, esencial para la producción de energía en las células. Su secuencia también se ha utilizado en diversos grupos de procariotas, incluidos los rhizobia, para el estudio de sus relaciones filogenéticas en comparación con las obtenidas a partir del gen ribosómico 16S (Christensen y Olsen, 1998; Christensen *et al.*, 2004; Menna *et al.*, 2009; Petersen *et al.*, 2001; Santillana *et al.*, 2008; Simoes *et al.*, 2007; Vinuesa *et al.*, 2005; Young y Park, 2007).

Los árboles resultantes tras el análisis filogenético de los genes *recA* y *atpD* se muestran en las figuras 32 y 33 y en las tablas 18 y 19, respectivamente. En comparación con el análisis de las secuencias obtenidas para el gen ribosómico 16S, se puede observar cómo la variabilidad entre ellas aumenta. Así, cepas con alta identidad (hasta del 100%) en el gen ribosómico 16S pueden poseer genes altamente variables que codifican para proteínas esenciales. Por ejemplo, como se ha demostrado ya, algunas cepas aisladas de *Viciae*, *Phaseolus* y *Trifolium* poseen secuencias prácticamente idénticas del ADNr 16S y, sin embargo, presentan identidades inferiores en los genes *recA* y *atpD*, como es el caso de la *Rhizobium* sp. bv. trifolii RTP05 (que presenta 92% de identidad en el gen *atpD*).

Además, la filogenia inferida con los genes *recA* y *atpD* no se corresponde exactamente a la del árbol resultante del análisis del ADNr 16S, sino que se asemeja más a la del gen *celC* (Figura 30), confirmando su validez como marcador taxonómico. Incluso se puede observar como las distancias inferidas en el análisis filogenético en base al gen *celC* son mayores que las obtenidas para los genes *recA* y *atpD*, por lo que parece que este gen permite una diferenciación incluso mejor entre especies filogenéticamente relacionadas. Por ejemplo, algunas especies del grupo de *R. leguminosarum* que presentan secuencias del gen ribosómico 16S idénticas con respecto a la cepa tipo del grupo (USDA2370^T), pero que en los genes *recA* y *atpD* sus identidades son inferiores al 94%, como la cepa RPV32, o incluso al 92%, como RTP05 (por lo que probablemente no pertenezcan a esta especie); presentan identidades del gen *celC* inferiores al 87% con respecto a la cepa USDA2370^T, lo que permite una mejor diferenciación entre ellas.

La cepa *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843, cuya clasificación taxonómica no ha sido sujeta a revisión según los nuevos principios de la taxonomía hasta la fecha, presentó un porcentaje de similitud en estos genes superior respecto a la cepa ATCC 14480, previamente denominada *Rhizobium trifolii*, que en relación a las cepas tipo de *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae USDA 2370^T y *Rhizobium phaseoli* ATCC 14482^T, sin embargo en todos los casos los valores de identidad fueron bajos. Las cepas que presentaron una mayor similitud para los genes *recA* y *atpD* respecto a la cepa ANU843 fueron *Rhizobium* sp. bv. phaseoli RPVR32 y *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii WSM2304, con valores superiores al 95%. Las siguientes especies en proximidad filogenética fueron *Rhizobium pisi* DSM 30132^T y *Rhizobium etli* CFN42^T, con porcentajes de similitud en torno al 92% y 93%, confirmando que son especies distintas.

Sin embargo, los porcentajes de similitud tan bajos encontrados entre esta cepa y el resto de cepas de referencia, por debajo del 95% para ambos genes, hacen suponer que nuestra cepa de estudio probablemente se trate de una especie diferente a las que

actualmente se encuentran descritas. Por tanto, la cepa ANU843 podría constituir una nueva especie dentro del género *Rhizobium*, aunque para concretarlo deberían realizarse estudios adicionales como hibridación ADN-ADN y pruebas fenotípicas. Por tanto, de momento la cepa ANU843 seguirá siendo denominada *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* en este estudio.

Hay que señalar que existen bajos porcentajes de similitud entre las cepas *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* WSM1325 y WSM2304 cuyo genoma ha sido recientemente secuenciado, por lo que sería necesario realizar estudios adicionales para asegurar si han sido correctamente clasificadas como *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* y/o si ambas pertenecen a la misma especie. En este caso, admitiendo la validez del gen *celC* como marcador taxonómico, se confirma que efectivamente estas cepas difieren significativamente entre sí, ya que el porcentaje de similitud entre ambas es tan solo del 88,4% para este gen.

Por último, aunque los análisis filogenéticos basados en genes estables localizados en el cromosoma, como los que acabamos de estudiar, son necesarios para establecer una taxonomía evolutivamente significativa, en el caso de los rizobia estos estudios suelen incluir genes relacionados con la capacidad de estas bacterias para inducir la formación de nódulos, ya que son buenos marcadores de la coevolución de los rizobios con su hospedador (Álvarez-Martínez *et al.*, 2009), así como de su origen biogeográfico (Aguilar *et al.*, 2004) y permiten entender mejor la especificidad en la simbiosis rizobia-leguminosa.

1.3.4. Análisis filogenético y comparación con el gen *nodC*

Los genes *nod* codifican la síntesis de los factores de nodulación, moléculas implicadas en la deformación de los pelos radicales y la división de las células corticales de la raíz que darán lugar a los nódulos durante el proceso de infección. Estos genes *nod* han coevolucionado en función de la especie de leguminosa hospedadora de manera que se logra la especificidad en el proceso (Broughton y Perret, 1999; Dobert *et al.*, 1994) y su filogenia se puede correlacionar con el rango de hospedador de la planta, como se ha descrito para los *nodB* (Wei *et al.*, 2003) y *nodC* (Álvarez-Martínez *et al.*, 2009; García-Fraile *et al.*, 2010; Iglesias *et al.*, 2007; Laguerre *et al.*, 2001; Rivas *et al.*, 2007).

De todo el conjunto de genes simbióticos, el gen *nodC* es esencial en la capacidad para nodular de todas las especies de rizobia de crecimiento rápido investigadas hasta el momento (Laguerre *et al.*, 2001), y codifica para una N- acetilglucosaminiltransferasa, que está implicada en el primer paso de la síntesis de los factores de nodulación. Además, su tamaño es suficientemente grande para que las relaciones filogenéticas inferidas del mismo sean consideradas válidas. Este gen ha sido analizado en muchas cepas de rizobios ya que está relacionado con su espectro de hospedador y su análisis filogenético ofrece información sobre la promiscuidad de los mismos (Birney *et al.*, 2007; García-Fraile *et al.*, 2010; Iglesias *et al.*, 2007; Laguerre *et al.*, 2001; Rivas *et al.*, 2007; Zurdo-Pineiro *et al.*, 2009).

Por otro lado, trabajos previos de nuestro grupo de investigación han mostrado que los perfiles de actividad celulásica obtenidos mediante zimogramas podrían estar relacionados con el rango de hospedador de los rizobios ya que las biovariedades dentro de la especie *R. leguminosarum* presentaron un perfil diferente (Jiménez-Zurdo, 1993).

Además, cepas de *Frankia* que nodulan plantas actinorrhizas pertenecientes a distintos grupos de inoculación cruzada también presentaron diferentes perfiles de isoenzimas con actividad celulolítica diferentes (Igual *et al.*, 2001).

Por tanto, a pesar de que la filogenia del gen *celC* coincide completamente con la de los genes cromosómicos conservados y teniendo en cuenta que en algunas cepas de rizobios este gen se encuentra en plásmidos, se compararon los resultados del análisis del gen *celC* también con los obtenidos al analizar el gen simbiótico *nodC*. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 20 y en la figura 34.

Actualmente las biovariedades de las especies de rizobia se están empezando a definir en función de la secuencia del gen *nodC*. En este sentido, las cepas aisladas de nódulos de leguminosas del género *Phaseolus* se han clasificado en las biovariedades denominadas phaseoli de las especies *R. phaseoli* (García-Fraile *et al.*, 2010), *R. giardinii*, *R. gallicum* (Amarger *et al.*, 1997) y *R. etli* (Wang *et al.*, 1999) y en las biovariedades giardinii y gallicum de las especies *R. giardini* y *R. gallicum* respectivamente (Amarger *et al.*, 1997). Por ello, para la comparación con el gen *celC* se seleccionaron las cepas de la misma especie analizada en el caso de los genes cromosómicos, incluyendo además cepas pertenecientes a diferentes biovariedades de la misma especie.

La distribución de los biovares es coherente con la filogenia del gen *nodC*. De esta forma, las cepas capaces de nodular diferentes leguminosas se encuentran separadas ocupando ramas distintas en los árboles con independencia de la especie a la que pertenecen en función de la clasificación mediante genes cromosómicos. Por ejemplo, las cepas de *R. leguminosarum* que nodulan *Vicia* (RVS03), *Trifolium* (ATCC14480) y *Phaseolus* (RPVF18) se encuentran claramente en ramas separadas, pese a presentar genes cromosómicos prácticamente idénticos (Figuras 31, 32 y 33), incluyendo el gen *celC* (Figura 30). Los mismos resultados se encontraron en el caso de *R. gallicum* cuyos dos biovares ocupan diferentes ramas (identidad del gen *nodC* inferior al 85%), mientras que sus genes *celC* correspondientes son idénticos.

Por otra parte, también encontramos casos a la inversa en el que los genes *celC* son bastante divergentes, como en las cepas de *Rhizobium gallicum*, *R. etli*, *R. phaseoli* y *R. leguminosarum* que pertenecen a la biovariedad phaseolus y por tanto presentan similitudes elevadas en el gen *nodC* (superiores al 96%). También *R. leguminosarum* y *R. pisi*, ambas aisladas a partir de nódulos de *Pisum*, tienen genes *nodC* casi idénticos, sin embargo, estas cepas tienen genes *recA*, *atpD* y *celC* distintos. Todos estos resultados confirman que no existe relación entre la filogenia del gen *celC* y *nodC* en el género *Rhizobium*.

En resumen, los resultados de este estudio mostraron una buena correlación en el género *Rhizobium* entre la filogenia del gen *celC* y varios genes cromosómicos con una tasa de evolución diferente, tales como el gen ribosómico 16S, y los genes *recA* y *atpD*, lo que indica que este gen es un posible marcador filogenético que podría utilizarse como auxiliar en estudios taxonómicos del género *Rhizobium*. Estos datos demuestran que nuestro gen de estudio se encuentra bastante conservado entre las especies del género *Rhizobium*, lo cual apoya una posible implicación en el proceso de infección, e incluso en la supervivencia en el medio ambiente a través de su intervención en la biosíntesis de celulosa. Por el contrario, no se encontró correlación entre las filogenias de los genes *celC* y *nodC* lo que sugiere que este gen no está relacionado con la especificidad de hospedador.

Tabla 16. Porcentajes de identidad en las secuencias del gen *celC* en las cepas de estudio

| | 1536 | RPVF18 | ATCC14480 | CCBAU71042 ^T | USDA2370 ^T | RVS03 | WSM1325 | RPT05 | CVIII14 | R201 | 3841 | DSM30132 ^T | WSM2304 | ANU843 | RPVR32 | CIAT 652 | ATCC14482 ^T | Mim-2 | CFN42 ^T | R602 ^T | PhD12 | USDA1844 ^T | K84 | ATCC11325 ^T | 163C | Br859 | CIAT899 ^T | 166 ^T | WSM419 | NGR234 |
|-------------------------|------|--------|-----------|-------------------------|-----------------------|-------|---------|-------|---------|------|------|-----------------------|---------|--------|--------|----------|------------------------|-------|--------------------|-------------------|-------|-----------------------|------|------------------------|------|-------|----------------------|------------------|--------|--------|
| RPVF18 | 99,9 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ATCC14480 | 98,9 | 98,9 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CCBAU71042 ^T | 99,2 | 99,2 | 98,2 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| USDA2370 ^T | 99,3 | 99,3 | 98,7 | 99,1 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| RVS03 | 98,5 | 98,6 | 97,6 | 98,4 | 98,8 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WSM1325 | 91,4 | 92,0 | 91,0 | 91,7 | 92,4 | 92,6 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| RPT05 | 91,8 | 92,0 | 91,0 | 91,7 | 92,4 | 92,6 | 100,0 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CVIII14 | 90,3 | 90,5 | 89,5 | 90,1 | 90,5 | 90,7 | 93,9 | 93,9 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R201 | 91,0 | 91,2 | 90,3 | 90,6 | 91,3 | 91,5 | 94,2 | 94,3 | 94,5 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3841 | 91,9 | 91,2 | 90,0 | 90,6 | 91,1 | 91,5 | 92,8 | 93,2 | 93,1 | 93,2 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| DSM30132 ^T | 87,7 | 87,7 | 87,0 | 87,6 | 88,0 | 87,3 | 86,4 | 86,4 | 86,3 | 86,4 | 85,7 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WSM2304 | 86,2 | 88,7 | 87,6 | 87,9 | 88,4 | 88,3 | 84,8 | 87,3 | 86,3 | 84,7 | 84,6 | 86,9 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ANU843 | 85,8 | 88,2 | 87,2 | 87,5 | 88,0 | 88,1 | 84,4 | 86,7 | 85,7 | 84,5 | 84,1 | 86,0 | | * | | | | | | | | | | | | | | | | |
| RPVR32 | 88,1 | 88,0 | 87,3 | 87,4 | 87,9 | 87,9 | 87,6 | 87,6 | 86,4 | 87,3 | 86,5 | 85,9 | 96,0 | | * | | | | | | | | | | | | | | | |
| CIAT 652 | 86,4 | 86,6 | 85,7 | 85,6 | 85,9 | 86,3 | 86,8 | 87,1 | 85,5 | 86,3 | 86,3 | 83,2 | 84,4 | 84,2 | | * | | | | | | | | | | | | | | |
| ATCC14482 ^T | 86,3 | 86,3 | 85,9 | 85,7 | 85,9 | 86,0 | 86,5 | 86,5 | 85,2 | 85,1 | 85,5 | 83,1 | 85,5 | 85,5 | 85,4 | 99,6 | * | | | | | | | | | | | | | |
| Mim-2 | 86,2 | 86,2 | 85,2 | 85,4 | 85,4 | 85,9 | 86,5 | 86,5 | 85,1 | 85,1 | 85,5 | 82,7 | 85,5 | 85,4 | 85,7 | 99,6 | 99,3 | * | | | | | | | | | | | | |
| CFN42 ^T | 86,7 | 86,7 | 85,8 | 85,9 | 86,4 | 86,5 | 85,9 | 85,7 | 85,2 | 86,0 | 85,3 | 84,4 | 83,9 | 84,0 | 84,9 | 87,8 | 86,9 | 86,5 | * | | | | | | | | | | | |
| R602 ^T | 74,2 | 74,4 | 72,7 | 72,9 | 73,2 | 73,6 | 74,1 | 74,1 | 74,4 | 73,2 | 73,7 | 70,5 | 72,8 | 73,1 | 73,4 | 73,6 | 73,0 | 73,5 | 71,9 | * | | | | | | | | | | |
| PhD12 | 73,7 | 73,7 | 72,8 | 72,8 | 73,0 | 72,8 | 73,4 | 73,4 | 73,4 | 72,6 | 72,9 | 70,4 | 72,2 | 72,2 | 72,9 | 73,0 | 72,9 | 72,9 | 71,3 | 100,0 | * | | | | | | | | | |
| USDA1844 ^T | 74,6 | 74,7 | 73,1 | 73,5 | 73,6 | 73,8 | 74,2 | 74,2 | 74,5 | 73,7 | 74,4 | 70,7 | 72,9 | 73,1 | 73,3 | 73,4 | 73,2 | 73,4 | 71,2 | 95,8 | 96,2 | * | | | | | | | | |
| K84 | 70,2 | 72,4 | 71,0 | 71,1 | 71,8 | 71,9 | 70,5 | 71,9 | 71,5 | 70,5 | 69,7 | 71,8 | 71,4 | 71,7 | 71,8 | 67,8 | 68,7 | 69,1 | 70,5 | 69,8 | 69,7 | 70,5 | * | | | | | | | |
| ATCC11325 ^T | 71,9 | 71,9 | 71,0 | 70,9 | 71,5 | 71,4 | 71,1 | 71,1 | 71,0 | 71,5 | 71,0 | 71,3 | 72,5 | 72,6 | 71,4 | 68,3 | 68,5 | 68,2 | 70,8 | 69,3 | 69,4 | 70,1 | 99,2 | * | | | | | | |
| 163C | 72,2 | 72,1 | 71,0 | 71,1 | 71,8 | 71,6 | 71,6 | 71,7 | 71,2 | 71,9 | 71,5 | 71,8 | 73,1 | 73,2 | 71,8 | 69,2 | 68,7 | 69,1 | 71,6 | 69,3 | 69,7 | 70,0 | 99,5 | 99,2 | * | | | | | |
| Br859 | 69,7 | 69,4 | 68,5 | 68,7 | 69,1 | 68,8 | 68,3 | 68,3 | 67,8 | 68,3 | 68,3 | 70,0 | 69,9 | 69,8 | 69,3 | 67,5 | 67,7 | 67,2 | 68,7 | 71,2 | 71,2 | 71,0 | 70,3 | 70,1 | 69,9 | * | | | | |
| CIAT899 ^T | 69,3 | 69,3 | 68,5 | 68,7 | 69,1 | 68,8 | 68,0 | 68,0 | 67,7 | 68,1 | 68,0 | 70,0 | 69,7 | 69,7 | 69,3 | 67,3 | 67,6 | 67,1 | 68,8 | 71,0 | 71,0 | 71,0 | 70,0 | 69,8 | 70,0 | 100,0 | * | | | |
| 166 ^T | 70,8 | 70,8 | 69,8 | 70,1 | 70,6 | 69,9 | 69,4 | 69,5 | 69,1 | 69,8 | 68,7 | 71,0 | 70,3 | 70,0 | 70,0 | 69,0 | 69,2 | 69,3 | 69,8 | 71,3 | 71,7 | 71,5 | 73,1 | 73,0 | 72,8 | 86,5 | 86,2 | * | | |
| WSM419 | 62,9 | 64,2 | 62,8 | 63,1 | 63,1 | 63,5 | 62,0 | 62,6 | 61,4 | 61,7 | 60,9 | 61,9 | 62,1 | 61,8 | 62,0 | 62,3 | 62,6 | 62,9 | 60,9 | 60,2 | 60,1 | 59,6 | 61,0 | 62,3 | 62,3 | 58,5 | 58,0 | 61,5 | * | |
| NGR234 | 63,8 | 64,0 | 63,1 | 63,5 | 63,3 | 63,4 | 63,4 | 63,3 | 63,4 | 63,4 | 63,8 | 63,5 | 64,4 | 63,7 | 63,4 | 64,9 | 65,2 | 65,1 | 62,4 | 61,7 | 61,8 | 62,4 | 60,1 | 60,5 | 61,3 | 60,2 | 59,8 | 63,1 | 69,0 | * |
| HI52 ^T | 64,4 | 64,6 | 63,5 | 63,6 | 63,9 | 63,9 | 63,6 | 63,6 | 63,9 | 63,8 | 64,4 | 63,6 | 63,4 | 63,6 | 62,9 | 63,9 | 63,6 | 63,6 | 62,2 | 61,3 | 60,9 | 61,0 | 62,2 | 61,5 | 62,0 | 59,7 | 59,6 | 61,4 | 65,6 | 65,2 |

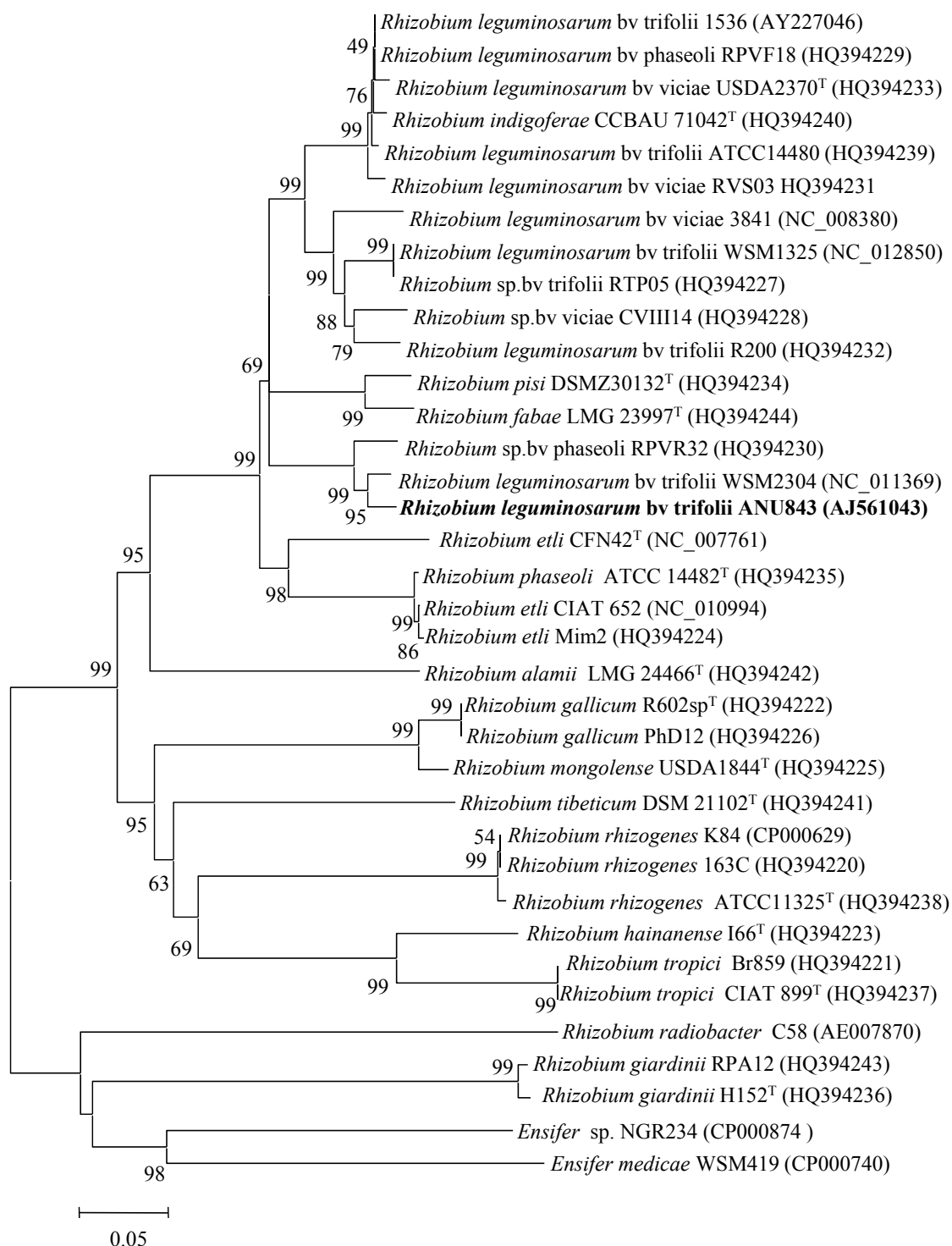


Figura 30. Árbol filogenético del gen *celC* (800 nt) de cepas tipo y aislados representativos de diferentes biovariedades del género *Rhizobium* obtenidas y de las especies actualmente descritas de la familia *Rhizobiaceae*. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas. La barra muestra 5 de cada 100 sustituciones nucleotídicas. Los números de acceso del GenBank aparecen entre paréntesis.

Tabla 17. Porcentajes de identidad en las secuencias del gen ribosómico 16S en las cepas de estudio.

| | ATCC11325 ^T | K84 | 163C | CIAT899 ^T | Br859 | I66 ^T | R602sp ^T | PhD12 | USDA1844 ^T | CCBAU71042 ^T | USDA 2370 ^T | RPVR32 | RPVF18 | ANU843 | 3841 | RVS03 | R200 | ATCC 14480 | RTP05 | CVIII14 | WSM2304 | WSM1325 | CIAT 652 | Mim-2 | CFN42 ^T | DSM 30132 ^T | ATCC 14482 ^T | NGR234 | WSM419 | H152 ^T | | |
|-------------------------|------------------------|------|------|----------------------|-------|------------------|---------------------|-------|-----------------------|-------------------------|------------------------|--------|--------|--------|------|-------|------|------------|-------|---------|---------|---------|----------|-------|--------------------|------------------------|-------------------------|--------|--------|-------------------|---|--|
| K84 | 99,9 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 163C | 99,9 | 99,9 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CIAT899 ^T | 98,9 | 99,1 | 99,1 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Br859 | 98,9 | 99,1 | 99,1 | 100 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| I66 ^T | 99,1 | 99,3 | 99,3 | 99,3 | 99,3 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R602sp ^T | 96,5 | 96,3 | 96,3 | 95,8 | 95,8 | 96,4 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PhD12 | 96,5 | 96,3 | 96,3 | 95,8 | 95,8 | 96,4 | 100 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| USDA1844 ^T | 96,6 | 96,8 | 96,8 | 96,3 | 96,3 | 96,3 | 99,4 | 99,4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CCBAU71042 ^T | 98,2 | 98,3 | 98,3 | 97,7 | 97,7 | 97,9 | 97,5 | 97,5 | 98,2 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| USDA 2370 ^T | 98,1 | 98,2 | 98,2 | 97,8 | 97,8 | 97,7 | 97,5 | 97,5 | 98,0 | 99,7 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| RPVR32 | 98,4 | 98,4 | 98,5 | 97,9 | 97,9 | 97,9 | 97,1 | 97,1 | 98,2 | 99,9 | 99,8 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| RPVF18 | 98,4 | 98,4 | 98,5 | 97,9 | 97,9 | 97,9 | 97,1 | 97,1 | 98,2 | 99,9 | 99,8 | 100 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ANU843 | 98,2 | 98,2 | 98,4 | 97,8 | 97,8 | 97,9 | 97,1 | 97,1 | 98,1 | 99,8 | 99,7 | 99,9 | 99,9 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3841 | 98,3 | 98,4 | 98,4 | 97,8 | 97,8 | 98,0 | 97,2 | 97,2 | 98,2 | 99,9 | 99,7 | 99,9 | 99,9 | 99,9 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| RVS03 | 98,4 | 98,4 | 98,5 | 97,9 | 97,9 | 97,9 | 97,2 | 97,2 | 98,2 | 99,9 | 99,8 | 100 | 100 | 99,9 | 99,9 | * | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R200 | 98,4 | 98,4 | 98,5 | 97,9 | 97,9 | 97,9 | 97,2 | 97,2 | 98,2 | 99,9 | 99,8 | 100 | 100 | 99,9 | 99,9 | 100 | * | | | | | | | | | | | | | | | |
| ATCC 14480 | 98,4 | 98,4 | 98,5 | 97,9 | 97,9 | 97,9 | 97,2 | 97,2 | 98,2 | 99,9 | 99,8 | 100 | 100 | 99,9 | 99,9 | 100 | 100 | * | | | | | | | | | | | | | | |
| RTP05 | 98,4 | 98,4 | 98,5 | 97,9 | 97,9 | 97,9 | 97,2 | 97,2 | 98,2 | 99,9 | 99,8 | 100 | 100 | 99,9 | 99,9 | 100 | 100 | 100 | * | | | | | | | | | | | | | |
| CVIII14 | 98,4 | 98,4 | 98,5 | 97,9 | 97,9 | 97,9 | 97,2 | 97,2 | 98,2 | 99,9 | 99,8 | 100 | 100 | 99,9 | 99,9 | 100 | 100 | 100 | 100 | * | | | | | | | | | | | | |
| WSM2304 | 98,4 | 98,5 | 98,4 | 97,9 | 97,9 | 97,9 | 97,2 | 97,2 | 98,2 | 99,9 | 99,8 | 99,9 | 99,9 | 99,8 | 99,9 | 99,9 | 99,9 | 99,9 | 99,9 | 99,9 | * | | | | | | | | | | | |
| WSM1325 | 98,4 | 98,5 | 98,5 | 97,9 | 97,9 | 97,9 | 97,1 | 97,1 | 98,2 | 99,9 | 99,8 | 100 | 100 | 99,9 | 99,9 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | * | | | | | | | | | | |
| CIAT 652 | 98,0 | 98,1 | 98,0 | 97,6 | 97,6 | 97,5 | 97,6 | 97,6 | 98,8 | 99,3 | 99,2 | 99,3 | 99,3 | 99,1 | 99,3 | 99,3 | 99,3 | 99,3 | 99,3 | 99,3 | 99,3 | 99,4 | 99,4 | * | | | | | | | | |
| Mim-2 | 98,0 | 98,1 | 98,0 | 97,6 | 97,6 | 97,5 | 97,6 | 97,6 | 98,8 | 99,3 | 99,2 | 99,3 | 99,3 | 99,1 | 99,3 | 99,3 | 99,3 | 99,3 | 99,3 | 99,3 | 99,3 | 99,4 | 99,4 | 100 | * | | | | | | | |
| CFN42 ^T | 98,0 | 98,1 | 98,0 | 97,5 | 97,5 | 97,6 | 97,7 | 97,7 | 98,4 | 98,9 | 98,8 | 98,9 | 98,9 | 98,9 | 99,1 | 98,9 | 98,9 | 98,9 | 98,9 | 98,9 | 98,9 | 99,1 | 99,1 | 99,6 | 99,6 | * | | | | | | |
| DSM 30132 ^T | 98,0 | 98,0 | 98,2 | 97,6 | 97,6 | 97,5 | 97,6 | 97,6 | 98,8 | 99,3 | 99,2 | 99,4 | 99,4 | 99,3 | 99,3 | 99,4 | 99,4 | 99,4 | 99,4 | 99,4 | 99,4 | 99,3 | 99,4 | 99,9 | 99,9 | 99,5 | * | | | | | |
| ATCC 14482 ^T | 98,0 | 98,0 | 98,1 | 97,5 | 97,5 | 97,5 | 97,6 | 97,6 | 98,8 | 99,3 | 99,2 | 99,4 | 99,4 | 99,2 | 99,3 | 99,3 | 99,3 | 99,3 | 99,3 | 99,3 | 99,3 | 99,3 | 99,3 | 99,7 | 99,7 | 99,3 | 99,8 | * | | | | |
| NGR234 | 96,1 | 96,3 | 96,3 | 95,5 | 95,5 | 95,7 | 95,9 | 95,9 | 96,2 | 95,7 | 95,7 | 96,0 | 96,0 | 96,0 | 96,0 | 96,0 | 96,0 | 96,0 | 96,0 | 96,0 | 96,0 | 96,0 | 96,0 | 95,9 | 95,9 | 96,1 | 95,9 | 95,9 | * | | | |
| WSM419 | 96,1 | 96,1 | 96,1 | 95,2 | 95,2 | 95,7 | 95,4 | 95,4 | 95,7 | 95,9 | 96,0 | 95,7 | 95,7 | 95,6 | 95,6 | 95,7 | 95,7 | 95,7 | 95,7 | 95,7 | 95,7 | 95,8 | 95,8 | 95,7 | 95,7 | 95,6 | 95,7 | 95,6 | 98,6 | * | | |
| H152 ^T | 96,6 | 96,5 | 96,5 | 95,7 | 95,7 | 95,6 | 95,1 | 95,1 | 95,0 | 95,6 | 95,6 | 96,0 | 96,0 | 95,9 | 95,9 | 96,0 | 96,0 | 96,0 | 96,0 | 96,0 | 96,0 | 96,0 | 96,0 | 95,8 | 95,8 | 95,8 | 95,8 | 95,7 | 96,3 | 96,5 | * | |
| C58 | 94,9 | 95,0 | 95,0 | 94,3 | 94,3 | 94,2 | 93,6 | 93,6 | 93,9 | 93,7 | 93,8 | 94,2 | 94,2 | 94,2 | 94,2 | 94,2 | 94,2 | 94,2 | 94,2 | 94,2 | 94,2 | 94,2 | 94,0 | 94,0 | 94,1 | 94,0 | 93,9 | 95,6 | 94,7 | 96,0 | | |

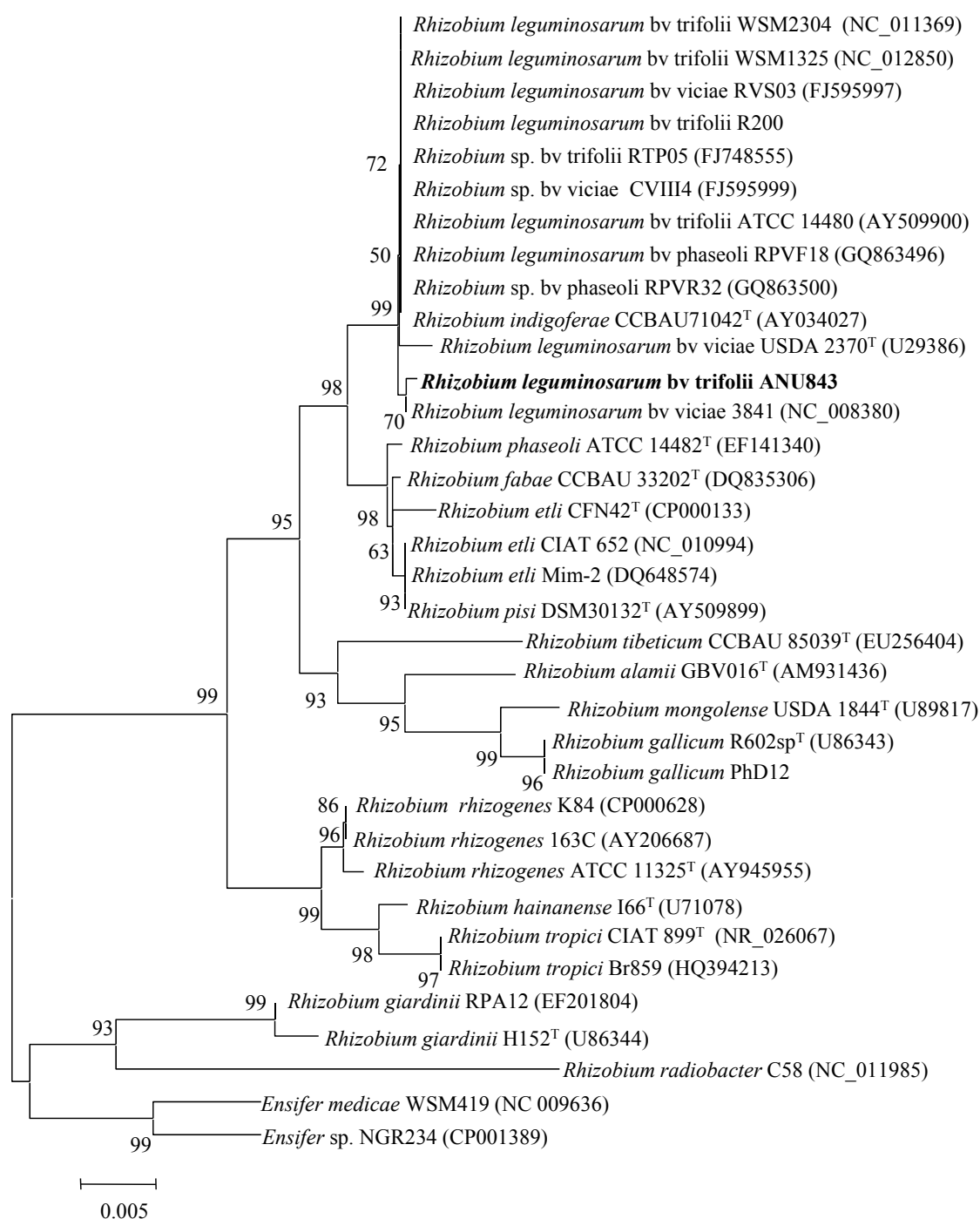


Figura 31. Árbol filogenético del gen ribosómico 16S (1475 nt) de cepas tipo y aislados representativos de diferentes biovariedades del género *Rhizobium* obtenidas y de las especies actualmente descritas de la familia *Rhizobiaceae*. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas. La barra muestra 5 de cada 1000 sustituciones nucleotídicas. Los números de acceso del GenBank aparecen entre paréntesis.

Tabla 18. Porcentajes de identidad en las secuencias del gen *recA* en las cepas de estudio.

| | USDA 2370 ^T | RPVF18 | ATCC 14480 | 3841 | CCBAU71042 ^T | RVS03 | WSM1325 | RTP05 | R200 | CVIII14 | DSM 30132 ^T | WSM2304 | RPVR32 | ANU843 | ATCC 14482T | Mim-2 | CIAT 652 | CFN42 ^T | USDA1844 ^T | R602 ^T | PhD12 | USDA 2370 ^T | Br859 | I66 ^T | NCPPB2437 ^T | I63C | K84 | |
|-------------------------|------------------------|--------|------------|------|-------------------------|-------|---------|-------|------|---------|------------------------|---------|--------|--------|-------------|-------|----------|--------------------|-----------------------|-------------------|-------|------------------------|-------|------------------|------------------------|------|------|--|
| RPVF18 | 100 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ATCC 14480 | 99,6 | 99,6 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3841 | 98,1 | 98,2 | 98,3 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CCBAU71042 ^T | 99,3 | 99,3 | 99,3 | 98,0 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| RVS03 | 100 | 99,4 | 99,6 | 97,6 | 99,3 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WSM1325 | 97,0 | 97,1 | 97,2 | 96,7 | 96,9 | 96,7 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| RTP05 | 97,1 | 97,1 | 97,1 | 96,6 | 96,9 | 97,5 | 99,8 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R200 | 96,4 | 96,6 | 96,4 | 96,8 | 96,4 | 96,3 | 98,2 | 97,9 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CVIII14 | 97,9 | 98,0 | 98,1 | 96,7 | 97,8 | 97,6 | 96,7 | 97,5 | 97,7 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| DSM 30132 ^T | 95,1 | 95,2 | 95,3 | 94,9 | 94,4 | 94,9 | 95,1 | 94,5 | 94,6 | 95,8 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WSM2304 | 95,1 | 95,2 | 95,5 | 93,2 | 94,4 | 94,3 | 93,0 | 93,3 | 93,2 | 93,3 | 94,1 | * | | | | | | | | | | | | | | | | |
| RPVR32 | 95,5 | 95,5 | 95,7 | 95,0 | 94,9 | 95,3 | 94,0 | 93,9 | 93,3 | 95,0 | 94,8 | 97,3 | * | | | | | | | | | | | | | | | |
| ANU843 | 95,5 | 95,4 | 95,5 | 94,7 | 94,7 | 95,2 | 94,3 | 94,3 | 93,7 | 94,9 | 93,5 | 96,2 | 96,4 | * | | | | | | | | | | | | | | |
| ATCC 14482 ^T | 91,1 | 91,1 | 91,1 | 90,8 | 90,4 | 91,2 | 90,6 | 90,6 | 89,2 | 90,4 | 90,6 | 91,3 | 92,0 | 91,4 | * | | | | | | | | | | | | | |
| Mim-2 | 91,6 | 91,9 | 91,6 | 91,8 | 90,7 | 91,4 | 91,3 | 90,7 | 90,0 | 91,1 | 91,3 | 91,8 | 92,2 | 91,6 | 99,6 | * | | | | | | | | | | | | |
| CIAT 652 | 91,6 | 91,9 | 91,6 | 92,0 | 90,7 | 91,2 | 92,0 | 90,7 | 90,0 | 90,0 | 91,2 | 92,1 | 92,2 | 91,6 | 99,6 | 100 | * | | | | | | | | | | | |
| CFN42 ^T | 91,6 | 91,9 | 92,0 | 91,1 | 90,4 | 91,0 | 91,4 | 90,7 | 90,2 | 90,5 | 91,9 | 92,1 | 92,2 | 91,8 | 90,6 | 91,3 | 92,8 | * | | | | | | | | | | |
| USDA1844 ^T | 90,4 | 90,4 | 90,6 | 89,8 | 90,2 | 90,3 | 89,6 | 89,5 | 88,9 | 90,4 | 89,6 | 89,8 | 91,0 | 89,0 | 88,5 | 88,3 | 88,3 | 88,5 | * | | | | | | | | | |
| R602 ^T | 90,0 | 90,0 | 90,2 | 89,4 | 89,8 | 89,9 | 89,2 | 89,1 | 88,5 | 90,0 | 89,2 | 89,0 | 90,2 | 88,6 | 88,5 | 88,3 | 88,3 | 88,1 | 97,7 | * | | | | | | | | |
| PhD12 | 90,6 | 91,0 | 90,6 | 90,6 | 89,5 | 90,3 | 90,3 | 89,8 | 89,9 | 91,2 | 90,3 | 89,9 | 90,8 | 89,5 | 88,8 | 89,5 | 89,5 | 89,0 | 97,2 | 99,6 | * | | | | | | | |
| USDA9030 ^T | 88,2 | 88,2 | 88,4 | 88,9 | 87,8 | 88,6 | 87,8 | 87,8 | 87,9 | 88,9 | 89,3 | 86,9 | 88,7 | 87,8 | 86,6 | 87,2 | 87,2 | 87,6 | 87,3 | 86,9 | 87,7 | * | | | | | | |
| Br859 | 88,2 | 88,5 | 88,4 | 89,3 | 87,8 | 88,7 | 88,2 | 87,8 | 88,2 | 89,3 | 89,6 | 87,1 | 88,8 | 87,8 | 86,5 | 87,5 | 87,5 | 87,7 | 87,3 | 86,9 | 88,0 | 100 | * | | | | | |
| I66 ^T | 89,2 | 89,3 | 89,2 | 90,1 | 88,7 | 88,6 | 89,2 | 89,1 | 89,6 | 89,8 | 90,4 | 88,2 | 90,0 | 89,2 | 89,2 | 89,8 | 89,4 | 88,7 | 88,7 | 88,2 | 89,2 | 95,8 | 96,0 | * | | | | |
| NCPPB2437 ^T | 88,9 | 88,9 | 89,1 | 88,9 | 88,2 | 89,2 | 88,7 | 88,8 | 88,7 | 89,1 | 89,3 | 86,7 | 87,8 | 87,2 | 86,6 | 86,9 | 86,9 | 88,7 | 88,1 | 87,7 | 88,3 | 93,1 | 93,1 | 93,2 | * | | | |
| I63C | 89,1 | 89,1 | 89,3 | 89,1 | 88,2 | 89,2 | 89,0 | 88,8 | 88,7 | 89,3 | 89,5 | 86,7 | 87,8 | 87,1 | 86,7 | 87,1 | 87,1 | 89,0 | 88,3 | 87,9 | 88,3 | 93,1 | 93,1 | 93,2 | 100 | * | | |
| K84 | 88,9 | 89,2 | 89,0 | 89,9 | 88,2 | 88,6 | 90,4 | 88,8 | 89,1 | 88,8 | 89,8 | 89,8 | 87,9 | 87,3 | 86,7 | 87,7 | 89,6 | 90,2 | 88,1 | 87,7 | 88,6 | 93,1 | 93,2 | 93,0 | 100 | 100 | * | |
| H152 ^T | 84,3 | 84,7 | 84,5 | 85,2 | 83,3 | 84,0 | 84,3 | 84,1 | 84,3 | 84,8 | 85,6 | 84,9 | 85,7 | 83,7 | 83,5 | 84,8 | 84,5 | 85,8 | 86,7 | 86,0 | 86,7 | 86,7 | 87,2 | 87,8 | 86,5 | 86,6 | 86,9 | |

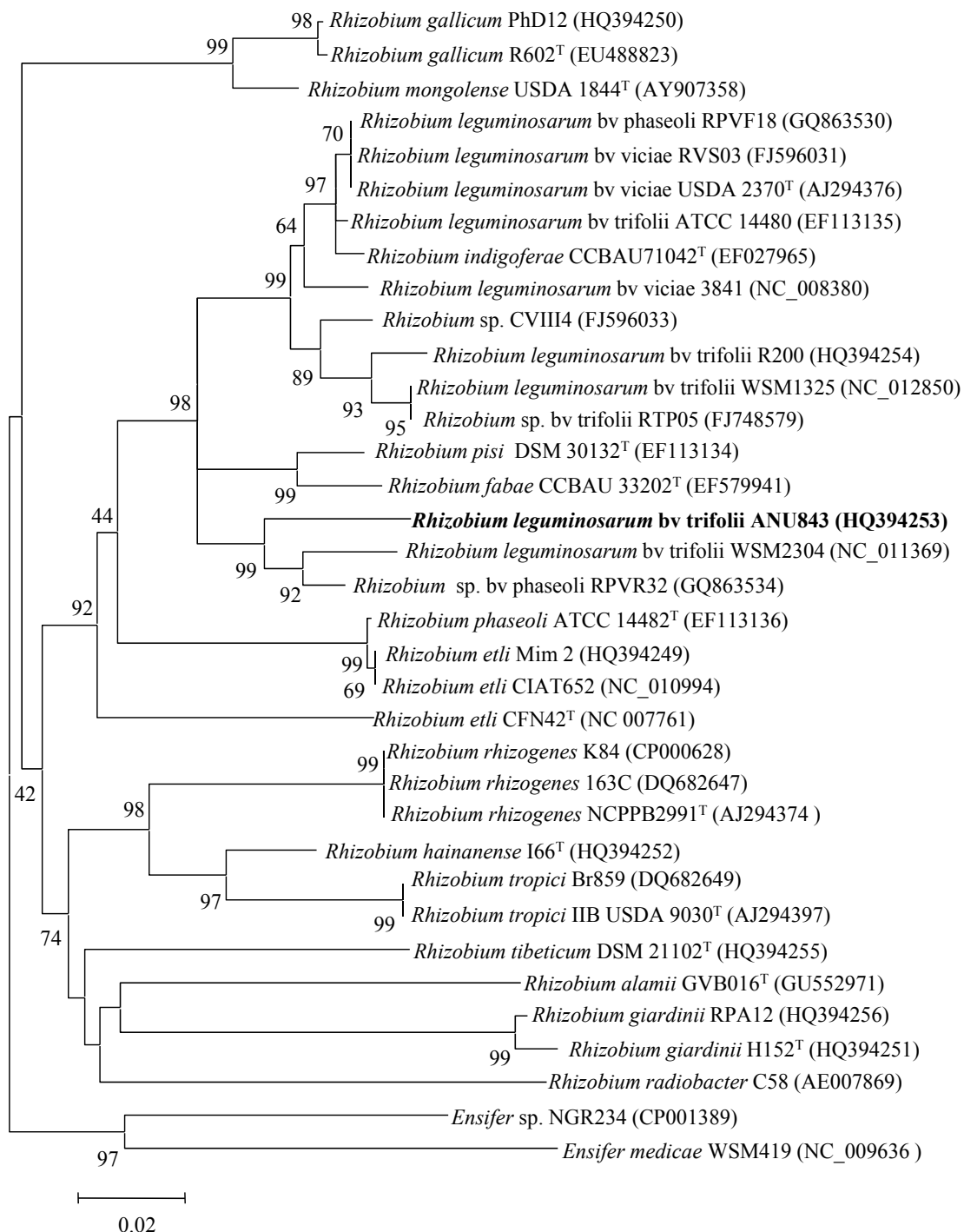


Figura 32. Árbol filogenético del gen *recA* (520 nt) de cepas tipo y aislados representativos de diferentes biovariedades del género *Rhizobium* obtenidas y de las especies actualmente descritas de la familia *Rhizobiaceae*. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas. La barra muestra 2 de cada 100 sustituciones nucleotídicas. Los números de acceso del GenBank aparecen entre paréntesis.

Tabla 19. Porcentajes de identidad en las secuencias del gen *atpD* en las cepas de estudio.

| | CFN42 ^T | Br859 | I66 ^T | K84 | 163C | NCPPB2991 ^T | C58 | R602sp ^T | PhD12 | USDA 1844 ^T | ATCC14482 ^T | NGR234 | HAMBI217 | WSM419 | A321 ^T | H152 ^T | DSM30132 ^T | ATCC14480 | RPVF18 | USDA2370 ^T | RVS03 | ANU843 | RPVR32 | WSM2304 | WSM1325 | RTP05 | R200 | CVIII1 | |
|------------------------|--------------------|-------|------------------|------|------|------------------------|------|---------------------|-------|------------------------|------------------------|--------|----------|--------|-------------------|-------------------|-----------------------|-----------|--------|-----------------------|-------|--------|--------|---------|---------|-------|------|--------|--|
| Br859 | 99,6 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| I66 ^T | 97,1 | 97,7 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| K84 | 93,2 | 93,5 | 93,7 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 163C | 93,2 | 93,1 | 93,2 | 99,6 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NCPPB2991 ^T | 94,3 | 94,8 | 93,8 | 97,0 | 97,0 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C58 | 91,4 | 91,9 | 91,8 | 89,9 | 91,0 | 92,0 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R602sp ^T | 89,8 | 90,3 | 90,9 | 90,0 | 90,0 | 88,3 | 89,3 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PhD12 | 90,0 | 90,5 | 90,9 | 90,0 | 90,0 | 88,5 | 89,6 | 99,6 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| USDA 1844 ^T | 89,6 | 90,0 | 90,9 | 90,7 | 90,7 | 89,0 | 89,3 | 98,2 | 98,2 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ATCC14482 ^T | 91,4 | 92,0 | 92,2 | 90,4 | 90,4 | 89,2 | 90,6 | 95,1 | 95,3 | 95,1 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NGR234 | 89,2 | 89,8 | 89,4 | 89,0 | 87,8 | 88,6 | 85,2 | 87,3 | 87,1 | 86,2 | 88,4 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| HAMBI217 | 89,8 | 90,3 | 89,2 | 88,9 | 88,9 | 88,6 | 88,0 | 88,2 | 88,4 | 87,8 | 90,7 | 93,2 | * | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WSM419 | 87,8 | 88,8 | 88,8 | 88,7 | 88,2 | 88,4 | 84,0 | 85,7 | 85,7 | 86,4 | 87,0 | 91,8 | 91,7 | * | | | | | | | | | | | | | | | |
| A321 ^T | 88,0 | 88,5 | 88,5 | 88,5 | 88,5 | 88,6 | 86,9 | 85,9 | 85,9 | 86,6 | 87,0 | 90,7 | 91,9 | 100 | * | | | | | | | | | | | | | | |
| H152 ^T | 91,4 | 91,6 | 92,0 | 90,2 | 89,8 | 90,9 | 89,0 | 90,0 | 90,0 | 90,3 | 90,0 | 88,6 | 88,5 | 88,8 | 88,5 | * | | | | | | | | | | | | | |
| DSM30132 ^T | 89,8 | 90,6 | 90,8 | 90,3 | 90,2 | 89,7 | 90,5 | 89,6 | 89,6 | 90,0 | 90,4 | 88,0 | 88,0 | 88,4 | 87,8 | 89,8 | * | | | | | | | | | | | | |
| ATCC14480 | 86,2 | 87,6 | 87,6 | 87,4 | 86,9 | 87,7 | 87,2 | 86,2 | 86,2 | 86,6 | 87,2 | 85,7 | 86,9 | 85,5 | 85,5 | 87,4 | 90,9 | * | | | | | | | | | | | |
| RPVF18 | 87,4 | 88,8 | 88,3 | 88,6 | 88,2 | 88,4 | 88,6 | 86,9 | 86,9 | 87,3 | 87,9 | 87,4 | 88,0 | 87,0 | 86,2 | 88,1 | 91,8 | 98,7 | * | | | | | | | | | | |
| USDA2370 ^T | 87,4 | 87,8 | 87,6 | 88,0 | 88,0 | 88,4 | 88,0 | 86,9 | 86,9 | 87,3 | 87,7 | 86,5 | 88,0 | 86,0 | 86,2 | 87,8 | 91,4 | 98,9 | 100 | * | | | | | | | | | |
| RVS03 | 87,2 | 88,2 | 87,8 | 87,9 | 88,5 | 88,5 | 87,7 | 86,8 | 86,8 | 87,2 | 87,8 | 86,7 | 87,7 | 85,8 | 86,1 | 87,8 | 91,5 | 98,7 | 99,2 | 99,1 | * | | | | | | | | |
| ANU843 | 89,4 | 89,3 | 89,6 | 89,6 | 89,6 | 89,5 | 87,7 | 87,3 | 87,5 | 87,8 | 88,6 | 89,6 | 87,3 | 87,2 | 86,8 | 89,6 | 92,8 | 92,8 | 93,0 | 93,1 | 92,9 | * | | | | | | | |
| RPVR32 | 89,2 | 90,4 | 90,4 | 89,8 | 89,8 | 89,5 | 88,3 | 87,5 | 87,5 | 87,5 | 88,8 | 88,9 | 88,5 | 87,7 | 87,3 | 89,8 | 93,2 | 93,9 | 94,8 | 94,4 | 94,6 | 95,3 | * | | | | | | |
| WSM2304 | 89,4 | 90,2 | 90,2 | 89,5 | 89,8 | 90,0 | 85,5 | 88,2 | 88,2 | 88,2 | 89,3 | 85,2 | 89,2 | 84,6 | 87,8 | 89,2 | 92,9 | 93,4 | 94,4 | 94,4 | 94,0 | 95,3 | 96,9 | * | | | | | |
| WSM1325 | 88,0 | 89,4 | 89,0 | 89,1 | 89,4 | 88,8 | 85,3 | 88,4 | 88,4 | 88,7 | 89,3 | 84,5 | 86,9 | 84,3 | 86,7 | 88,3 | 92,6 | 92,1 | 93,2 | 92,6 | 91,9 | 93,2 | 92,8 | 94,5 | * | | | | |
| RTP05 | 88,0 | 89,8 | 89,0 | 89,5 | 89,4 | 88,8 | 87,1 | 88,4 | 88,4 | 88,7 | 89,3 | 87,3 | 86,9 | 87,3 | 86,7 | 88,3 | 92,9 | 92,1 | 93,2 | 92,6 | 92,7 | 93,2 | 93,4 | 92,8 | 99,1 | * | | | |
| R200 | 88,0 | 89,8 | 89,4 | 90,4 | 89,8 | 89,0 | 88,1 | 88,0 | 88,0 | 88,7 | 88,8 | 87,7 | 87,6 | 88,7 | 88,0 | 89,4 | 92,9 | 92,6 | 93,4 | 93,0 | 92,8 | 93,2 | 93,6 | 93,2 | 97,6 | 97,9 | * | | |
| CVIII1 | 90,5 | 91,8 | 91,0 | 90,2 | 89,7 | 89,0 | 88,2 | 90,0 | 90,0 | 90,0 | 90,4 | 88,8 | 88,7 | 88,8 | 88,4 | 90,2 | 93,9 | 92,4 | 93,0 | 92,7 | 92,5 | 94,3 | 94,5 | 94,0 | 96,4 | 96,8 | 96,8 | * | |
| 3841 | 88,5 | 89,4 | 89,6 | 89,0 | 89,8 | 89,3 | 85,5 | 88,7 | 88,7 | 89,1 | 89,3 | 84,5 | 87,4 | 84,1 | 87,1 | 89,8 | 92,4 | 91,7 | 92,4 | 91,9 | 91,9 | 93,4 | 93,2 | 94,6 | 96,9 | 95,2 | 96,4 | 96,0 | |

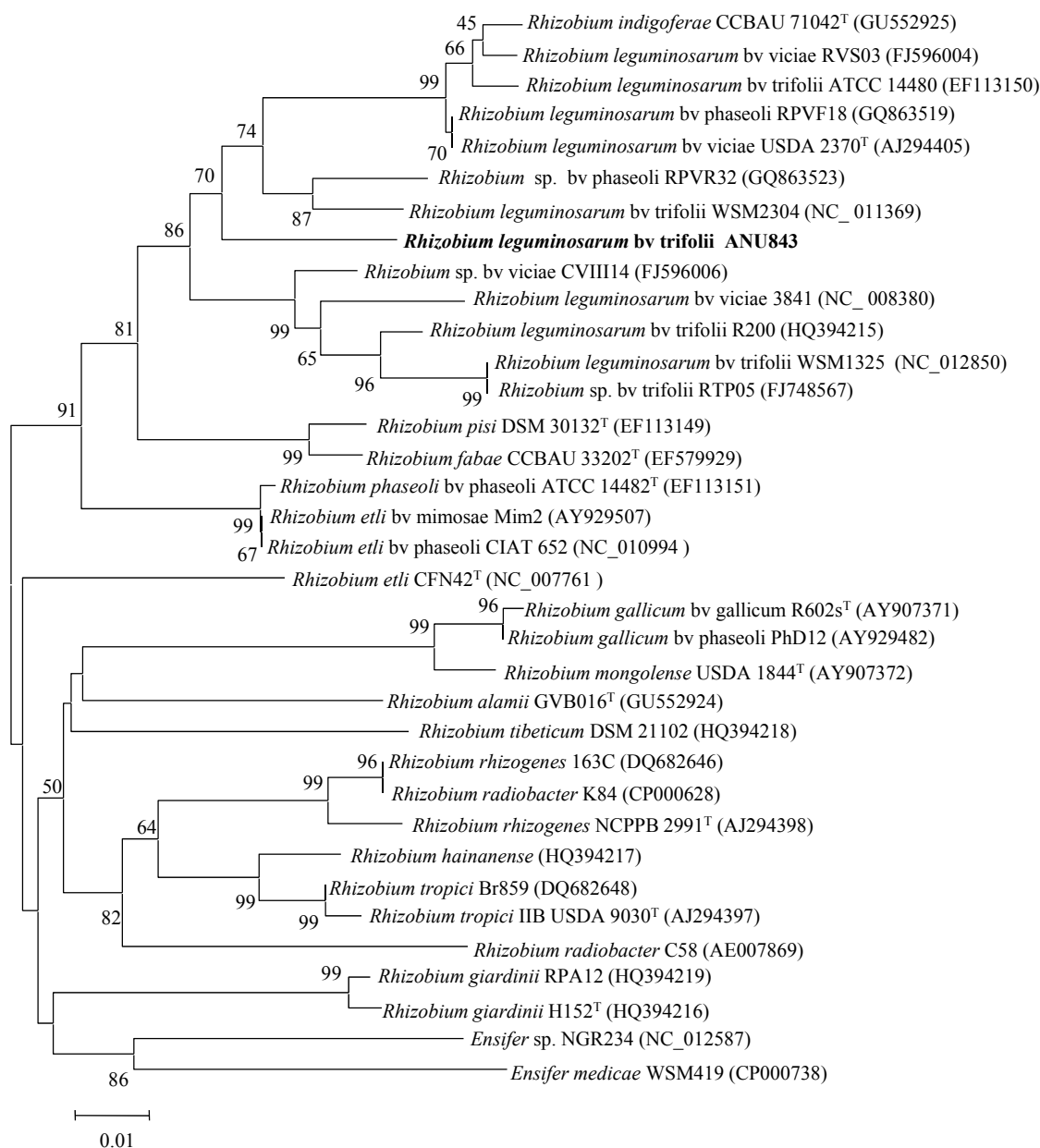


Figura 33. Árbol filogenético del gen *atpD* (500 nt) de cepas tipo y aislados representativos de diferentes biovariedades del género *Rhizobium* obtenidas y de las especies actualmente descritas de la familia *Rhizobiaceae*. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas. La barra muestra 1 de cada 100 sustituciones nucleotídicas. Los números de acceso del GenBank aparecen entre paréntesis.

Tabla 20. Porcentajes de identidad entre secuencias del gen *nodC* en las cepas de estudio.

| | WSM419 | USDA1844 ^T | NGR234 | USDA257 | Br859 | CIAT899 ^T | R602sp ^T | Mim-2 | H152 ^T | CFN42 ^T | ATCC14482 ^T | RPVR32 | CIAT 652 | RPVF18 | PhD12 | 166 ^T | ANU843 | WSM1325 | WSM2304 | RTP05 | R200 | ATCC14480 | DSM30132 ^T | USDA2370 ^T | 3841 | RVS03 | |
|------------------------|--------|-----------------------|--------|---------|-------|----------------------|---------------------|-------|-------------------|--------------------|------------------------|--------|----------|--------|-------|------------------|--------|---------|---------|-------|------|-----------|-----------------------|-----------------------|------|-------|--|
| USDA1844 ^T | 89,2 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NGR234 | 72,6 | 74,3 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| USDA257 | 70,9 | 72,5 | 99,0 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Br859 | 73,8 | 73,8 | 74,7 | 73,8 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CIAT899 ^T | 73,9 | 74,0 | 74,7 | 73,8 | 100 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| R602sp ^T | 75,4 | 76,7 | 78,6 | 78,1 | 75,4 | 75,8 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mim-2 | 75,5 | 77,5 | 79,3 | 78,7 | 76,3 | 76,4 | 96,9 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| H152 ^T | 77,8 | 79,2 | 80,4 | 79,7 | 79,4 | 79,9 | 90,4 | 91,6 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CFN42 ^T | 67,9 | 68,5 | 72,2 | 69,8 | 75,4 | 76,0 | 81,8 | 81,6 | 83,1 | * | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ATCC14482 ^T | 72,7 | 74,5 | 74,6 | 74,1 | 75,1 | 75,8 | 81,0 | 81,5 | 82,6 | 99,5 | * | | | | | | | | | | | | | | | | |
| RPVR32 | 71,6 | 73,5 | 74,9 | 74,5 | 75,1 | 75,8 | 81,9 | 81,4 | 83,2 | 96,8 | 96,3 | * | | | | | | | | | | | | | | | |
| CIAT 652 | 67,0 | 67,8 | 71,9 | 69,5 | 75,1 | 75,8 | 82,0 | 81,3 | 83,0 | 97,0 | 96,3 | 100 | * | | | | | | | | | | | | | | |
| RPVF18 | 72,7 | 74,3 | 75,2 | 74,7 | 76,0 | 76,3 | 82,8 | 81,5 | 83,9 | 96,8 | 96,6 | 99,9 | 99,9 | * | | | | | | | | | | | | | |
| PhD12 | 72,1 | 73,8 | 75,6 | 75,1 | 75,3 | 75,9 | 81,6 | 81,6 | 83,1 | 97,1 | 96,8 | 98,7 | 98,7 | 98,6 | * | | | | | | | | | | | | |
| 166 ^T | 72,0 | 70,9 | 71,4 | 71,1 | 71,9 | 72,2 | 74,5 | 72,4 | 74,2 | 73,9 | 73,4 | 72,6 | 73,0 | 72,4 | 73,0 | * | | | | | | | | | | | |
| ANU843 | 71,6 | 72,0 | 71,9 | 71,3 | 70,2 | 70,4 | 71,3 | 72,1 | 72,9 | 68,9 | 68,8 | 67,5 | 67,4 | 68,5 | 68,1 | 68,2 | * | | | | | | | | | | |
| WSM1325 | 69,3 | 69,1 | 67,6 | 66,4 | 70,6 | 70,6 | 71,4 | 71,9 | 72,7 | 63,8 | 68,1 | 67,3 | 63,3 | 68,6 | 67,8 | 67,6 | 96,8 | * | | | | | | | | | |
| WSM2304 | 72,7 | 72,3 | 72,3 | 71,7 | 71,3 | 71,3 | 71,3 | 71,7 | 73,4 | 70,2 | 70,1 | 69,0 | 69,0 | 68,9 | 69,6 | 67,4 | 97,8 | 96,1 | * | | | | | | | | |
| RTP05 | 72,0 | 71,9 | 72,2 | 71,6 | 71,7 | 71,7 | 70,3 | 71,3 | 72,5 | 69,0 | 68,8 | 67,5 | 67,5 | 67,6 | 68,1 | 67,2 | 96,7 | 95,3 | 96,3 | * | | | | | | | |
| R200 | 71,4 | 71,4 | 72,0 | 71,4 | 71,4 | 71,5 | 70,1 | 70,9 | 72,2 | 69,0 | 68,7 | 67,5 | 67,6 | 67,7 | 68,1 | 67,2 | 96,3 | 94,8 | 95,9 | 99,5 | * | | | | | | |
| ATCC14480 | 66,5 | 67,5 | 66,4 | 64,9 | 69,3 | 69,6 | 71,1 | 71,7 | 71,3 | 64,7 | 68,7 | 68,2 | 64,3 | 69,3 | 68,4 | 66,5 | 83,5 | 82,1 | 82,5 | 82,9 | 82,7 | * | | | | | |
| DSM30132 ^T | 75,4 | 76,8 | 75,1 | 74,4 | 72,6 | 72,5 | 75,6 | 75,3 | 76,2 | 71,6 | 71,3 | 71,2 | 71,2 | 71,5 | 71,2 | 70,7 | 76,8 | 75,9 | 76,5 | 76,2 | 75,8 | 76,0 | * | | | | |
| USDA2370 ^T | 75,2 | 76,9 | 75,4 | 74,7 | 72,9 | 72,8 | 75,6 | 75,4 | 76,4 | 72,0 | 71,8 | 71,7 | 71,7 | 72,0 | 71,7 | 70,6 | 76,7 | 75,8 | 76,2 | 76,3 | 75,8 | 75,8 | 98,9 | * | | | |
| 3841 | 71,6 | 72,4 | 69,4 | 67,7 | 71,5 | 71,9 | 74,9 | 75,4 | 74,7 | 66,0 | 69,7 | 69,7 | 65,9 | 71,2 | 69,9 | 69,5 | 75,4 | 72,8 | 75,5 | 75,6 | 75,2 | 72,3 | 95,1 | 96,1 | * | | |
| RVS03 | 74,3 | 75,8 | 73,7 | 73,0 | 71,6 | 71,8 | 74,6 | 75,4 | 74,6 | 70,3 | 69,9 | 69,7 | 69,6 | 71,4 | 69,9 | 69,9 | 75,3 | 74,6 | 75,6 | 75,3 | 74,9 | 74,6 | 95,1 | 96,1 | 100 | * | |
| CVIII14 | 73,9 | 75,4 | 73,6 | 73,1 | 71,1 | 71,4 | 75,4 | 76,1 | 75,1 | 71,6 | 71,2 | 71,0 | 70,9 | 72,7 | 71,2 | 69,7 | 75,1 | 74,7 | 75,2 | 75,0 | 74,6 | 73,8 | 93,3 | 93,6 | 94,2 | 94,2 | |

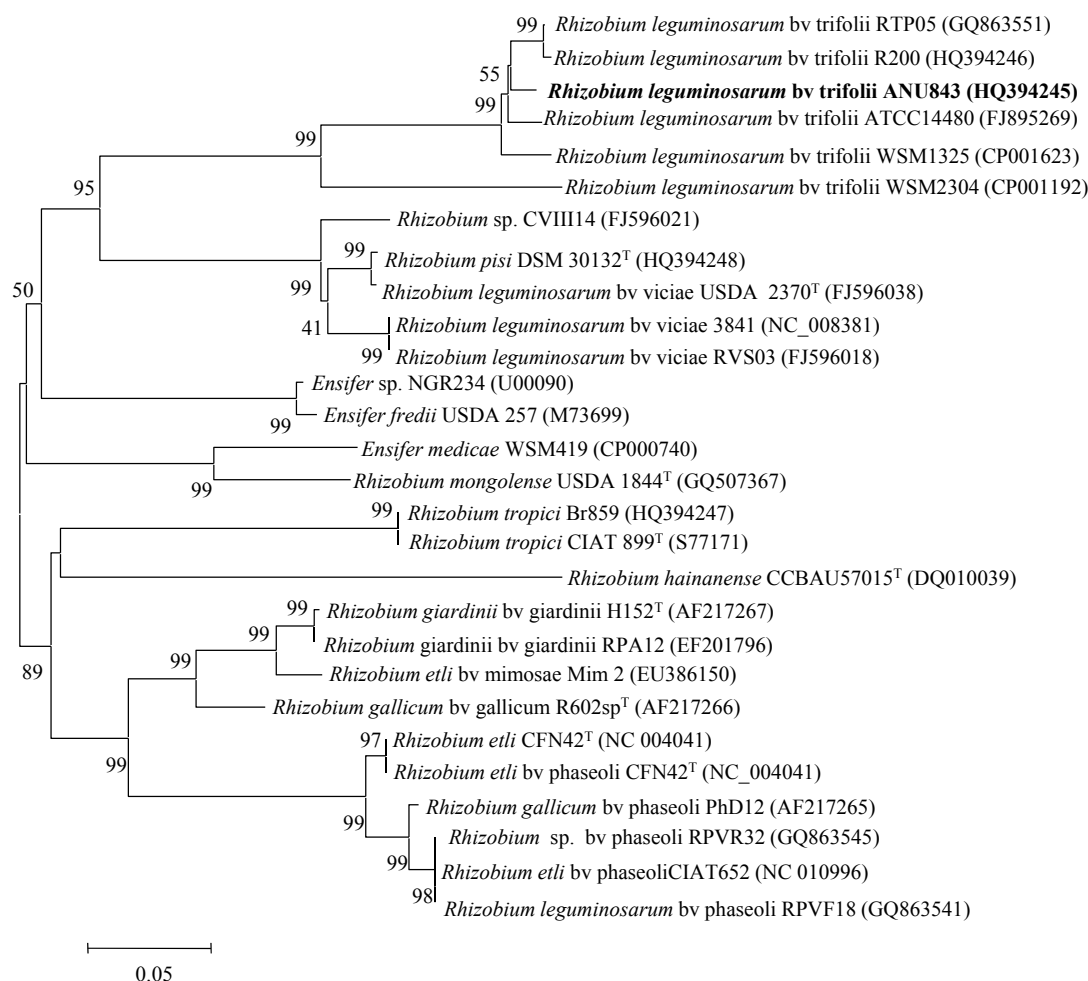


Figura 34. Árbol filogenético del gen *nodC* (840 nt) de cepas tipo y aislados representativos de diferentes biovariedades del género *Rhizobium* obtenidas y de las especies actualmente descritas de la familia *Rhizobiaceae*. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas. La barra muestra 5 de cada 100 sustituciones nucleotídicas. Los números de acceso del GenBank aparecen entre paréntesis.

2. PRODUCCIÓN DE CELULOSA EN RHIZOBIA

La biosíntesis de celulosa es un rasgo característico de las plantas, sin embargo, esta capacidad también se ha descrito en hongos y en algunas bacterias, e incluso en un grupo de animales, los urocordados (Matthysse *et al.*, 2004). Dentro de los procariotas, la biosíntesis de la celulosa ha sido detectada principalmente en bacterias Gram negativas y ha sido ampliamente estudiada en *Gluconacetobacter xylinum* (antes llamado *Acetobacter xylinum*) (Ross *et al.*, 1987). Sin embargo, esta capacidad también es común en algunas especies de cianobacterias, y se ha descrito en la bacteria Gram positiva *Sarcina ventriculi* (Lasa y Penades, 2006; Nobles *et al.*, 2001; Ross *et al.*, 1991).

Entre los múltiples factores que determinan el desarrollo de una simbiosis efectiva entre los rizobios y sus plantas hospedadoras, aquéllos relacionados con la colonización y adhesión de las bacterias a la superficie de las raíces, etapa clave para su posterior entrada en la planta, aún no han sido ampliamente caracterizados. Tal y como se describe en el apartado 4.1.2 de la introducción, la celulosa es uno de los polisacáridos que participan en estas etapas de adhesión y anclaje de las bacterias a los pelos radicales y a la superficie de la raíz, mediante su disposición en microfibrillas (Dazzo *et al.*, 1984; Mateos *et al.*, 1995; Smit *et al.*, 1992).

Nuestro grupo de investigación previamente ha conseguido detectar microfibrillas de celulosa producidas por la cepa ANU843 de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii asociadas al anclaje a las raíces de su planta hospedadora, trébol (Mateos *et al.*, 1995). Este fenotipo también ha sido caracterizado en la cepa R200, perteneciente a la misma biovariedad (Ausmees *et al.*, 1999) y en la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae 3841 (Williams *et al.*, 2008). Sin embargo, la capacidad de sintetizar celulosa no es uno de los caracteres fenotípicos que se estudia de forma habitual a la hora de describir las especies de bacterias capaces de establecer simbiosis fijadoras de nitrógeno en nódulos de leguminosas. Así, no se conoce si esta capacidad se encuentra conservada entre los distintos géneros de las especies actualmente conocidas y por ello decidimos estudiar la producción de celulosa en rhizobia.

2.1. Estudio de la biosíntesis de celulosa en rhizobia

Se han descrito diferentes ensayos cualitativos de selección de microorganismos productores de celulosa gracias a la capacidad de algunas sustancias de unir de forma específica este polisacárido, como el Rojo Congo o el Calcoflúor (Ausmees *et al.*, 1999; Kneen y Larue, 1983). Sin embargo, hasta ahora el trabajo de Kneen y Larue de 1983 es el único en el que se ha comparado la capacidad de distintos rizobios de producir celulosa, y en él estos autores sólo utilizaron cepas de las 6 especies con capacidad de nodular que había descritas hasta esa fecha.

Como se ha expuesto anteriormente, en la actualidad, la mayoría de las bacterias capaces de formar simbiosis fijadoras de nitrógeno en nódulos de leguminosas se encuentran dentro del orden *Hyphomicrobiales*, que incluye 83 especies distribuidas en diferentes familias y géneros. La mayoría de las cepas tipo oficiales de cada uno de estos taxones descritos al comenzar este estudio dentro de los géneros denominados como “rhizobia” y algunos no-rhizobia pertenecientes a las α - Proteobacterias e incluidos en los géneros *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum* y *Devosia* capaces de nodular fueron examinadas para determinar su capacidad de producción de celulosa por tinción con Rojo Congo (Figura 35).

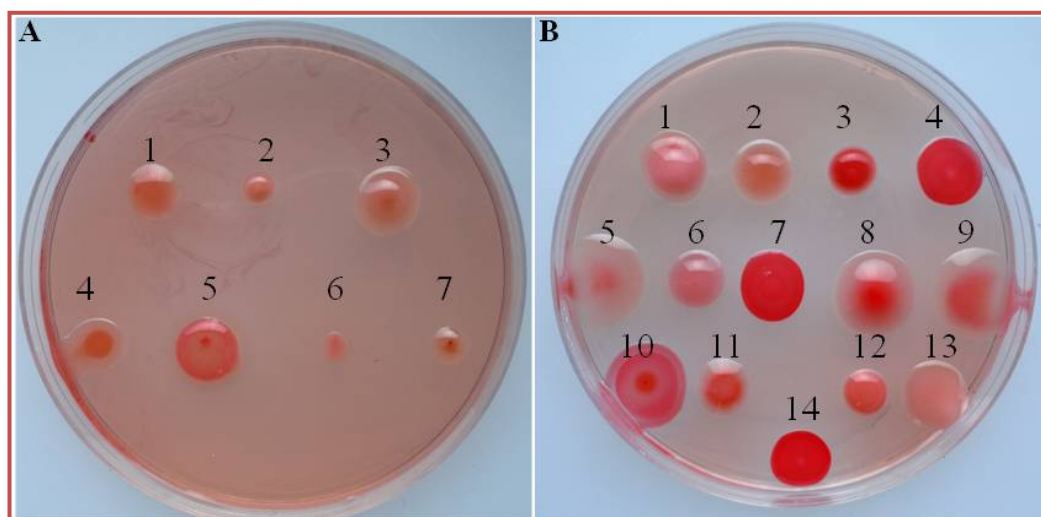


Figura 35. Producción de celulosa en distintas cepas analizadas. A) Cepas tipo representativas de los géneros analizados: 1. *R. phaseoli* ATCC 14482^T, 2. *S. meliloti* ATCC 9930^T, 3. *M. loti* ATCC 33669^T, 4. *B. elkanii* LMG 6134^T, 5. *P. trifolii* PETPO2^T, 6. *A. caulinodans* ORS 571^T, 7. *D. neptuniae* J1^T. B) Cepas tipo del género *Rhizobium*: 1. *R. hainanense* I66^T, 2. *R. leguminosarum* ATCC10004^T, 3. *R. galegae* ATCC 43677^T, 4. *R. etli* CFN 42^T, 5. *R. lusitanum* P1-7^T, 6. *R. loessense* CCBAU 7190B^T, 7. *R. giardinii* H152^T, 8. *R. mongolense* USDA 1844^T, 9. *R. indigoferae* CCBAU 71042^T, 10. *R. tropici* CIAT 899^T, 11. *R. yanglingense* CCBAU 71623, 12. *R. huautlense* SO2^T, 13. *R. gallicum* R602sp^T, 14. *R. cellulosityticum* ALA10B2^T.

Tras 7 días de crecimiento en placas de YMA que contenían este colorante (CR-YMA), todos resultaron positivos, aunque algunos en menor grado (Tabla 21). Para poder evaluar dicha capacidad cualitativamente, elaboramos una escala con cuatro niveles a partir de especies que tomamos como representativas de cada uno de ellos (Figura 36). Estos niveles corresponden aproximadamente con los descritos en el trabajo de Kneen y Larue para los rizobios crecidos en CR-YMA: rosa pálido, rosa, naranja y rojo; correspondientes a los tonos 43C, 51B, 34B y 46C de la “*Royal Horticultural Society Colour Chart*” (Royal Horticultural Society, 1966) respectivamente. Este ensayo se repitió al menos tres veces con cada cepa, ya que se observó una cierta variabilidad en la afinidad por el Rojo Congo, y los resultados mostrados corresponden con la intensidad detectada más frecuentemente.

Tabla 21. Producción de celulosa en distintas cepas tipo y de referencia de microorganismos que establecen simbiosis con leguminosas y afines en placas de YMARC: (+++) colonias que adquieren una coloración rojo intenso, (++) anaranjada, (+) rosada y (w) rosa claro. Las especies de rhizobia clásicos están en negrita, el resto son especies de no-rhizobia capaces nodular. (*) Especies cuya capacidad de nodulación no ha sido descrita, incluidas en géneros tradicionalmente considerados rhizobia.

| GÉNERO | CEPA | PLANTA HOSPEDADORA | PRODUCCIÓN DE CELULOSA |
|--|---|--|------------------------|
| Rhizobium | <i>R. cellulosilyticum</i> ALA10B2 ^T | <i>Medicago</i> | +++ |
| | <i>R. etli</i> CFN 42 ^T | <i>Phaseolus</i> | +++ |
| | <i>R. galegae</i> ATCC 43677 ^T | <i>Galega</i> | +++ |
| | <i>R. gallicum</i> R602sp ^T | <i>Phaseolus</i> | + |
| | <i>R. giardinii</i> H152 ^T | <i>Phaseolus</i> | +++ |
| | <i>R. hainanense</i> I66 ^T | <i>Desmodium</i> | + |
| | <i>R. huautlense</i> SO2 ^T | <i>Sesbania</i> | + |
| | <i>R. indigoferae</i> CCBAU 71042 ^T | <i>Indigofera</i> | + |
| | <i>R. leguminosarum</i> ATCC10004 ^T | <i>Pisum</i> | + |
| | <i>R. leguminosarum</i> by. trifolii ANU843 | <i>Trifolium</i> | ++ |
| | <i>R. loessense</i> CCBAU 7190B ^T | <i>Astragalus</i> | ++ |
| | <i>R. lusitanum</i> P1-7 ^T | <i>Phaseolus</i> | + |
| | <i>R. mongolense</i> USDA 1844 ^T | <i>Medicago</i> | +++ |
| | <i>R. radiobacter</i> ATCC 19358 ^T | * | + |
| | <i>R. rhizogenes</i> ATCC 11325 ^T | <i>Phaseolus</i> | ++ |
| | <i>R. sullae</i> IS123 ^T | <i>Hedysarum</i> | + |
| | <i>R. rubi</i> ATCC 13335 ^T | * | ++ |
| | <i>R. phaseoli</i> ATCC 14482 ^T | <i>Phaseolus</i> | + |
| | <i>R. pisi</i> DSM 30132 ^T | <i>Pisum</i> | ++ |
| | <i>R. tropici</i> CIAT 899 ^T | <i>Phaseolus</i> | + |
| <i>R. undicola</i> LMG 11875 ^T | <i>Neptunia</i> | + | |
| <i>R. vitis</i> ATCC 49767 ^T | * | ++ | |
| <i>R. yanglingense</i> CCBAU 71623 | <i>Amphicarpaea</i> | + | |
| Sinorhizobium (Ensifer) | <i>S. arboris</i> LMG 14919 ^T | <i>Acacia</i> | + |
| | <i>S. fredii</i> LMG 6217 ^T | <i>Glycine</i> | + |
| | <i>S. kostiense</i> LMG 19227 ^T | <i>Acacia</i> | w |
| | <i>S. meliloti</i> ATCC 9930 ^T | <i>Medicago</i> | + |
| | <i>S. meliloti</i> 1021 | <i>Medicago</i> | w |
| | <i>S. medicae</i> LMG1037 ^T | <i>Medicago</i> | + |
| | <i>S. medicae</i> WSM419 | <i>Medicago</i> | + |
| | <i>S. morelense</i> Lc04 ^T | * | ++ |
| | <i>S. sahelii</i> LMG7837 ^T | <i>Acacia</i> | ++ |
| | <i>S. terangae</i> LMG6463 ^T | <i>Acacia</i> | + |
| | <i>S. xinjiangense</i> LMG17930 ^T | <i>Glycine</i> | + |
| | Mesorhizobium | <i>M. amorphae</i> ACCC 19665 ^T | <i>Amorpha</i> |
| <i>M. chacoense</i> Pr5 ^T | | <i>Prosopis</i> | w |
| <i>M. ciceri</i> USDA 3383 ^T | | <i>Cicer</i> | + |
| <i>M. huakuii</i> USDA 4779 ^T | | <i>Astragalus</i> | + |
| <i>M. loti</i> ATCC 33669 ^T | | <i>Lotus</i> | + |
| <i>M. mediterraneum</i> USDA 3392 ^T | | <i>Cicer</i> | ++ |
| <i>M. plurifarum</i> LMG 7836 ^T | | <i>Acacia</i> | + |
| <i>M. septentrionale</i> HAMB1 2582 ^T | | <i>Astragalus</i> | + |
| <i>M. tianshanense</i> LMG 18976 ^T | | <i>Sophora</i> | ++ |
| <i>M. temperatum</i> HAMB1 2583 ^T | | <i>Astragalus</i> | w |
| Phyllobacterium | <i>P. trifolii</i> PETPO2 ^T | <i>Trifolium</i> | + |
| Bradyrhizobium | <i>B. betae</i> pl7Hg ^T | * | + |
| | <i>B. canariense</i> BTA1 ^T | <i>Chamaecytisus</i> | +++ |
| | <i>B. elkanii</i> LMG 6134 ^T | <i>Glycine</i> | + |
| | <i>B. japonicum</i> LMG 6138 ^T | <i>Glycine</i> | + |
| | <i>B. liaoningense</i> LMG 18230 ^T | <i>Glycine</i> | + |
| | <i>B. yuanmingense</i> LMG 21827 ^T | <i>Lespedeza</i> | + |
| Azorhizobium | <i>A. caulinodans</i> ORS 571 ^T | <i>Sesbania</i> | + |
| Devosia | <i>D. neptuniae</i> J1 ^T | <i>Neptunia</i> | ++ |
| Ochrobactrum | <i>O. lupini</i> LUP21 ^T | <i>Lupinus</i> | + |
| | <i>O. tritici</i> LMG18957 ^T | <i>Cytisus</i> | + |

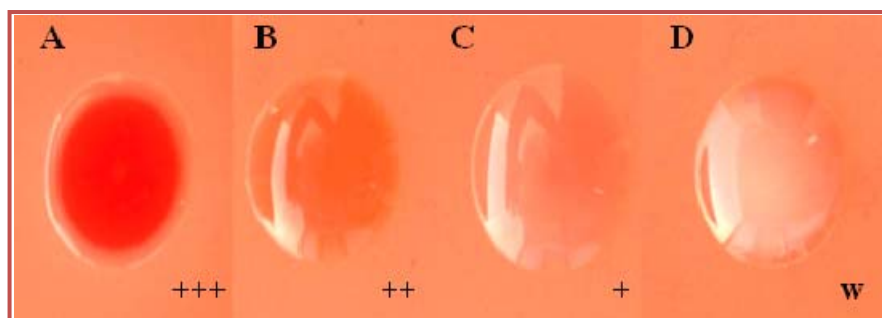


Figura 36. Escala cualitativa de producción de celulosa a partir de cuatro cepas tipo representativas que tienen diferente afinidad por el Rojo Congo. Esta escala ha sido la utilizada como referencia para evaluar la producción en el resto de las cepas mostradas en la tabla 21. De mayor a menor intensidad: A) *R. cellulosilyticum* ALA10B2^T (+++); B) *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843 (++); C) *R. hainanense* I66^T (+) y D) *S. kostiense* LMG 19227^T (w: débil). Elaboración propia.

Como se puede observar, la capacidad de producción de celulosa varía notablemente entre especies de distintos géneros (Figura 35 A), e incluso encontramos diferencias bastante significativas entre especies de un mismo género (Figura 35 B). Esta variabilidad coincide con la obtenida previamente en el trabajo de Kneen y Larue (1986) y los resultados obtenidos en las especies ya descritas en 1986 también son similares, como en el caso de *R. meliloti* (actualmente *E. meliloti*) y *R. japonicum* (actualmente *B. japonicum*), en los que ya se había observado una menor afinidad por el Rojo Congo en comparación con otras especies.

Así, los microorganismos que presentaron una mayor capacidad para producir celulosa fueron en general los que se encuentran dentro de los géneros *Rhizobium* y *Mesorhizobium*, entre los que cabe destacar *R. galegae* ATCC 43677^T y *R. etli* CFN 42^T (Figura 35 B: colonias 3 y 4; tabla 21). Mientras que los representantes de los géneros *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium* mostraron una menor afinidad por este colorante (Figura 35 A y tabla 21). Dentro de estos grupos, se encuentran algunas cepas en las que la capacidad de producir celulosa es bastante débil o dudosa como *S. kostiense* LMG 19227^T (Figura 36 D) o *S. meliloti* 1021. Por otro lado, en principio parece no existir una relación entre una mayor o menor capacidad de biosíntesis de celulosa y la actividad celulolítica de estas cepas, aunque la cepa *R. cellulosilyticum* ALA10B2^T, denominada así por su gran capacidad para producir celulasas, es una de las que presenta una mayor afinidad por el Rojo Congo de las estudiadas (Figura 35 B; colonia 14).

Aunque está descrito que el Rojo Congo es capaz de unirse también a proteínas externas de membrana en algunos patógenos animales (Theisen *et al.*, 1993), varios autores han observado que en *Rhizobium*, la tinción con este colorante se puede relacionar con el contenido en celulosa en los cultivos bacterianos (Ausmees *et al.*, 1999; Zevenhuizen *et al.*, 1986). Los resultados obtenidos al analizar mutantes incapaces de producir celulosa, que se detallarán en el capítulo V de esta memoria, también parecen confirmar que *Rhizobium* no produce otras sustancias que se unan al Rojo Congo significativamente.

La capacidad de producir celulosa de todos los microorganismos capaces de nodular ensayados, parece apoyar la importancia de este polímero en la

supervivencia de estas bacterias en el medio. Por otro lado, pese a que la inactivación de la biosíntesis de celulosa en *R. leguminosarum* bv. *trifolii* no afecta la capacidad de nodular trébol en condiciones controladas de laboratorio (Ausmees *et al.*, 1999), el beneficio que obtienen los rizobios gracias a su capacidad de adherirse firmemente al sustrato mediante las microfibrillas de celulosa facilita la colonización de las raíces (Dazzo *et al.*, 1984; Mateos *et al.*, 1995) y probablemente adquiera mayor importancia simbiótica en las condiciones naturales de la rizosfera.

2.2. Caracterización molecular del operón *celABC* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843

Como ya se comentó anteriormente, se han localizado ortólogos al gen que codifica para la endoglucanasa CelC2 en el genoma de una amplia diversidad de eubacterias capaces de sintetizar celulosa pertenecientes a distintos géneros (*Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Gluconacetobacter*, *E. coli*, *Salmonella*...). En todas estas eubacterias, el gen *celC* está localizado en una región del cromosoma de unas 6 Kb, cerca de genes que codifican proteínas involucradas en la biosíntesis de celulosa denominados *celABC* (o *bcsABZ*) (Ausmees *et al.*, 1999; Matthyse *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 1990).

Este operón fue descrito por primera vez en la bacteria *Acetobacter xylinum* (actualmente *Gluconacetobacter xylinum*) y posteriormente Matthyse y colaboradores consiguieron clonar en 1995 una región de 11 Kb del cromosoma de *A. tumefaciens* (actualmente *Rhizobium radiobacter*) que contenía este operón y comprobar que los genes que lo forman también participan en la síntesis de celulosa en este patógeno. Posteriormente, mediante mutagénesis con Tn5 se han localizado los genes implicados en la biosíntesis de celulosa en *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* que presentan homología y básicamente la misma organización que los genes correspondientes en *A. tumefaciens* (Ausmees *et al.*, 1999).

Sin embargo, en el momento de iniciar la caracterización funcional del operón *celABC* en este trabajo, no se hallaba disponible la secuencia completa del genoma de la especie *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Así, para conocer mejor la zona adyacente al gen *celC*, se procedió a la secuenciación del operón *celABC* de la cepa ANU843 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.

2.2.1. Secuenciación

La secuenciación de la zona del genoma de ANU843 “aguas arriba” del gen *celC* fue llevada a cabo mediante el diseño de oligonucleótidos a partir del alineamiento con las secuencias disponibles en las bases de datos. La secuencia obtenida contenía un fragmento de 5806 pares de bases con tres marcos de lectura abiertos (ORFs). Esta organización conserva la estructura principal descrita en la cepa R200 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. La secuencia “aguas arriba” del gen

celC, reveló dos ORFs de mayor tamaño que se transcriben en el mismo sentido y que presentan homología con los genes *celA* y *celB*.

Un análisis con el programa BLASTN de la secuencia nucleotídica frente a las bases de datos disponibles en la actualidad, reveló que esta estructura (*celABC*) es similar y se encuentra altamente conservada entre todas las bacterias del género *Rhizobium* cuyo genoma se encuentra disponible en la actualidad, presentando cerca de un 100% de identidad con *Rleg1293/Rleg1295/Rleg1295* y *Rleg2_1204/Rleg2_120/Rleg2_1206* de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM2304 y WSM1325, respectivamente, un 89% al operón *celABC* de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* R200 (Ausmees *et al.*, 1999), un 88% a *celA/celB/celC* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (Young *et al.*, 2006), un 86% a *celABC* de *R. etli* CFN42 (González *et al.*, 2006), un 77% a *celABC* de *Rhizobium* sp. NGR234 (Schmeisser *et al.*, 2009), un 91% a *celABC* de *A. tumefaciens* C58 (Goodner *et al.*, 2001) y un 73% a *Smed_5208, Smed_5209, Smed_5210* de *Sinorhizobium medicae* WSM419.

Un análisis más exhaustivo de cada uno de los productos codificados por este operón por separado con el programa BLASTP, reveló una alta identidad (por encima del 50%) con todas las proteínas homólogas presentes en los rhizobia y la existencia de proteínas con alta homología a las de este operón en otras bacterias que nodulan leguminosas como *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 y otros microorganismos que establecen simbiosis fijadoras de nitrógeno como *Azospirillum* (Tabla 22). Sin embargo, en la mayoría de los casos estas proteínas no aparecen anotadas como CelA, CelB y CelC.

Tabla 22. Porcentaje de homología de CelA, CelB y CelC de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 con otras proteínas de algunos microorganismos que establecen simbiosis con plantas (datos obtenidos con el programa BLASTP).

| CEPA | CelA | CelB | CelC |
|--|------|------|------|
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> ANU843 | 100% | 100% | 100% |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM2304 | 100% | 100% | 98% |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM1325 | 98% | 100% | 86% |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> R201 | 100% | 100% | 89% |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841 | 96% | 100% | 87% |
| <i>Rhizobium etli</i> CIAT 652 | 96% | 90% | 90% |
| <i>Rhizobium etli</i> CFN42 | 97% | 89% | 90% |
| <i>Rhizobium</i> sp. NGR234 | 78% | 52% | 59% |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 | 73% | 53% | 56% |
| <i>Agrobacterium radiobacter</i> K84 | 86% | 70% | 74% |
| <i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419 | 78% | 50% | 58% |
| <i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060 | 65% | 30% | 41% |
| <i>Azospirillum</i> sp. B510 | 54% | 25% | 41% |

La presencia del operón de biosíntesis de celulosa *celABC* en nuestra cepa de estudio concuerda con los datos experimentales obtenidos por nuestro grupo de investigación en los que se describe la capacidad de producción de microfibrillas

de celulosa por parte de la cepa ANU843 de *R. leguminosarum* bv. trifolii (Mateos *et al.*, 1995). Por otra parte, la comparación a nivel de secuencia de la región *celABC* de distintos rizobios, ha revelado la existencia de un alto grado de conservación a nivel de organización genética y de homología entre cada una de las proteínas que conforman el operón. El análisis comparativo muestra un mayor grado de homología con la celulosa sintetasa CelA, seguida de la endoglucanasa CelC. El menor grado de homología lo presentó la proteína de función desconocida, CelB. Sin embargo, en los genomas actualmente disponibles de algunas cepas relacionadas filogenéticamente, como *S. meliloti* 1021 (Galibert *et al.*, 2001) o *M. loti* MAFF303099 (Kaneko *et al.*, 2000), no se han identificado regiones homólogas a la del operón *celABC*.

2.2.2. Análisis de la expresión

En el modelo propuesto por Matthyse y colaboradores en 1995, los genes *celA*, *celB* y *celC* se transcriben en la misma dirección y, a su vez, de forma opuesta al otro operón identificado en esta zona del genoma y denominado *celDE* (Figura 38). Pese a que no consiguieron encontrar una secuencia Shine-Dalgarno al comienzo del operón, identificaron un marco de lectura para el *celA* de 710 aminoácidos, cuyo final se solapa con el inicio del gen *celB* (ATGA), lo cual apoyó la idea de que estos genes se transcriben conjuntamente. Por su parte, el gen *celC* constituye el tercer ORF, comenzando 73 aa por debajo del final del *celB*. Este marco de lectura se apoya en la identificación de un motivo Shine-Dalgarno 4 pares de bases “aguas arriba” de un posible inicio de la transcripción (GAGGGGGT**ATG**) que probablemente marque el inicio del tercer gen del operón (Matthyse *et al.*, 1995).

Por su parte, Ausmees y colaboradores proponen que la organización de los operones implicados en la biosíntesis de celulosa en la cepa R200 *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii es muy similar a la propuesta por Matthyse para *A. tumefaciens*, pero difieren en el *celDE* ya que si bien parece que existe un gen homólogo al gen *celE* en su cepa de estudio, no aparece ningún homólogo al gen *celD*. Por otro lado, respecto al gen *celC* estos autores también proponen que el principio de la transcripción se solapa con el final del gen *celB* (ATGA) que, según su modelo, consta de 822 aminoácidos (125 más que el ORF propuesto para *A. tumefaciens*), defendiendo la idea de que estos tres genes se transcriben conjuntamente (Ausmees *et al.*, 1999).

La secuencia obtenida para el operón *celABC* de *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843 reveló una estructura similar a la de la cepa R200. En ella además, siguen existiendo los tres posibles comienzos alternativos para la transcripción del *celA*, pero ORF más corto que comienza en el tercero de los sitios propuestos se encuentra precedido por un motivo Shine-Dalgarno, lo que le convierte en el principal candidato. Para el comienzo del *celC*, también encontramos dos sitios probables del inicio de la transcripción, aunque el propuesto por Ausmees y colaboradores que da lugar a una proteína de 347 aminoácidos, nos parece el más probable.

Para estudiar el patrón de expresión de este operón, se llevó a cabo la

obtención la retrotranscripción del ARN de la cepa ANU843 y posteriormente la amplificación por PCR del ADN complementario (ADNc) de fragmentos intra- e intergénicos de similar tamaño (400-600 pb) del operón *celABC*. Como control negativo, se utilizó una muestra de ADN, en la que se observó el correcto funcionamiento de los cebadores diseñados y, como control negativo, una muestra de ARN en la que pudo descartarse la presencia de ADN residual que pudiera dar lugar a falsos positivos (Figura 37). Así, en el caso de la muestra de ADNc, se observa que efectivamente existe un transcrito único que engloba los tres genes (Figura 37), ya que en todos los casos la amplificación fue positiva.

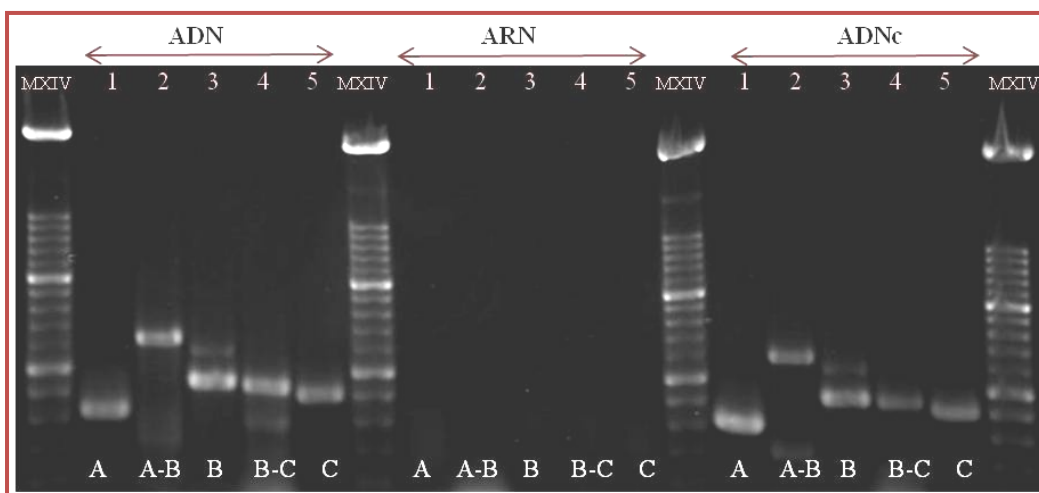


Figura 37. Amplificación de fragmentos intra- e intergénicos del operón *celABC* en muestras de ADN (control positivo), ARN (control negativo) y ADNc respectivamente para confirmar el patrón de expresión de los genes en *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843. Los “primers” utilizados y el fragmento amplificado en cada carril son: 1. ocelF1- icela (fragmento de *celA* de 420 pb), 2. ocelF5 – celB1R (fragmento entre *celA* y *celB* de 620 pb), 3. celCB1F- ocelR3 (fragmento de *celB* de 440 pb), 4. celB2F – icelC (fragmento entre *celB* y *celC* de 425pb) y 5. ocelC3F- C2R (fragmento de *celC* de 420 pb). MXIV: marcador de peso molecular cuyos tamaños de banda son 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500 y 2642 pares de bases.

Sin embargo, no se puede descartar que exista algún tipo de mecanismo de regulación interna o postranscripcional de forma que el gen *celC* pueda tener una expresión independiente a sus predecesores. De hecho, se ha localizado un posible promotor compuesto por una caja -10 (TGGCGCAAT) y otra -35 (TTGCCT) aguas arriba del gen *celC*. Estudios futuros deberán abordar de forma más exhaustiva el patrón de expresión de este gen mediante técnicas como la amplificación de los extremos 5' de los transcritos primarios (RACE) y fusiones transcripcionales que además permitan conocer el patrón de expresión en experimentos *in vivo*.

2.3. Análisis *in silico* del operón *celABC* y la región adyacente

Una vez observada la gran conservación de este operón entre los miembros de la familia *Rhizobiaceae*, nos propusimos llevar a cabo un estudio bioinformático comparativo más exhaustivo de esta región del cromosoma presente en gran cantidad de bacterias que sintetizan celulosa. El primer gen del operón, denominado *bcsA* (*bacterial cellulose synthesis*) cuando se describió, actualmente también se conoce como *acsA* o *celA*. Codifica una celulosa sintetasa y contiene un dominio β -glicosiltransferasa 2 (GT2). Es la proteína más larga y conservada en el operón y se ha demostrado que se une al sustrato UDP-glucosa (Lin *et al.*, 1990). El segundo gen, que fue denominado *bcsB* (sinónimos: *acsB*, *celB*), codifica una proteína capaz de unir di-GMP y se encuentra menos conservado que el resto de los genes del operón.

Por su parte, el gen descrito como *bcsZ*, también llamado *cmc* (*carboximetilcellulase*) y *celC* en los miembros de la familia *Rhizobiaceae*, codifica una celulasa perteneciente a la familia 8 de las glicosil hidrolasas (GH8), que está presente en todas las especies productoras de celulosa. Existen otros genes como los denominados *bcsC* y *bcsD* que se requieren *in vivo* pero no *in vitro* para la biosíntesis de la celulosa (Saxena *et al.*, 1994). El proceso de biosíntesis de celulosa y el papel que juega en él la proteína CelC, serán abordados más ampliamente en el Capítulo V de esta memoria.

Como se ha expuesto anteriormente, el primer organismo de la familia *Rhizobiaceae* en el que se describió este operón fue *Agrobacterium tumefaciens* (Matthysse *et al.*, 1995). En la cepa C58 existen dos operones implicados en la biosíntesis de celulosa (*celABC* y *celDE*) (Figura 38). Posteriormente, se identificó un cuarto gen cuando el genoma completo de esta cepa fue secuenciado, que fue denominado *celG* y cuya mutación produce una superproducción de celulosa (Matthysse *et al.*, 2005). Curiosamente, este gen no se localizó en las cepas R200 y RBL5523 de *Rhizobium leguminosarum* (Ausmees *et al.*, 1999; Laus *et al.*, 2005a) pese a que existen homólogos a *celG* “aguas abajo” del gen *celC* en todas las bacterias de la familia *Rhizobiaceae* cuyo genoma está secuenciado (Figura 38). Este gen no aparece anotado como *celG* en el resto de los genomas y codifica para proteínas homólogas de función desconocida.

Por otro lado, homólogos al gen *celE* de *A. tumefaciens*, que forma parte de un operón que se transcribe de forma inversa al *celABC*, sólo se han encontrado por secuenciación de fragmentos clonados en las cepas R200 y RBL5523 de *Rhizobium leguminosarum* (Ausmees *et al.*, 1999; Laus *et al.*, 2005a), aunque quizá la secuenciación del genoma completo de estas cepas aclararía estas diferencias. Tampoco se han encontrado homólogos al gen *celD* en las inmediaciones del operón *celABC* en ninguno de los genomas secuenciados (Figura 38).

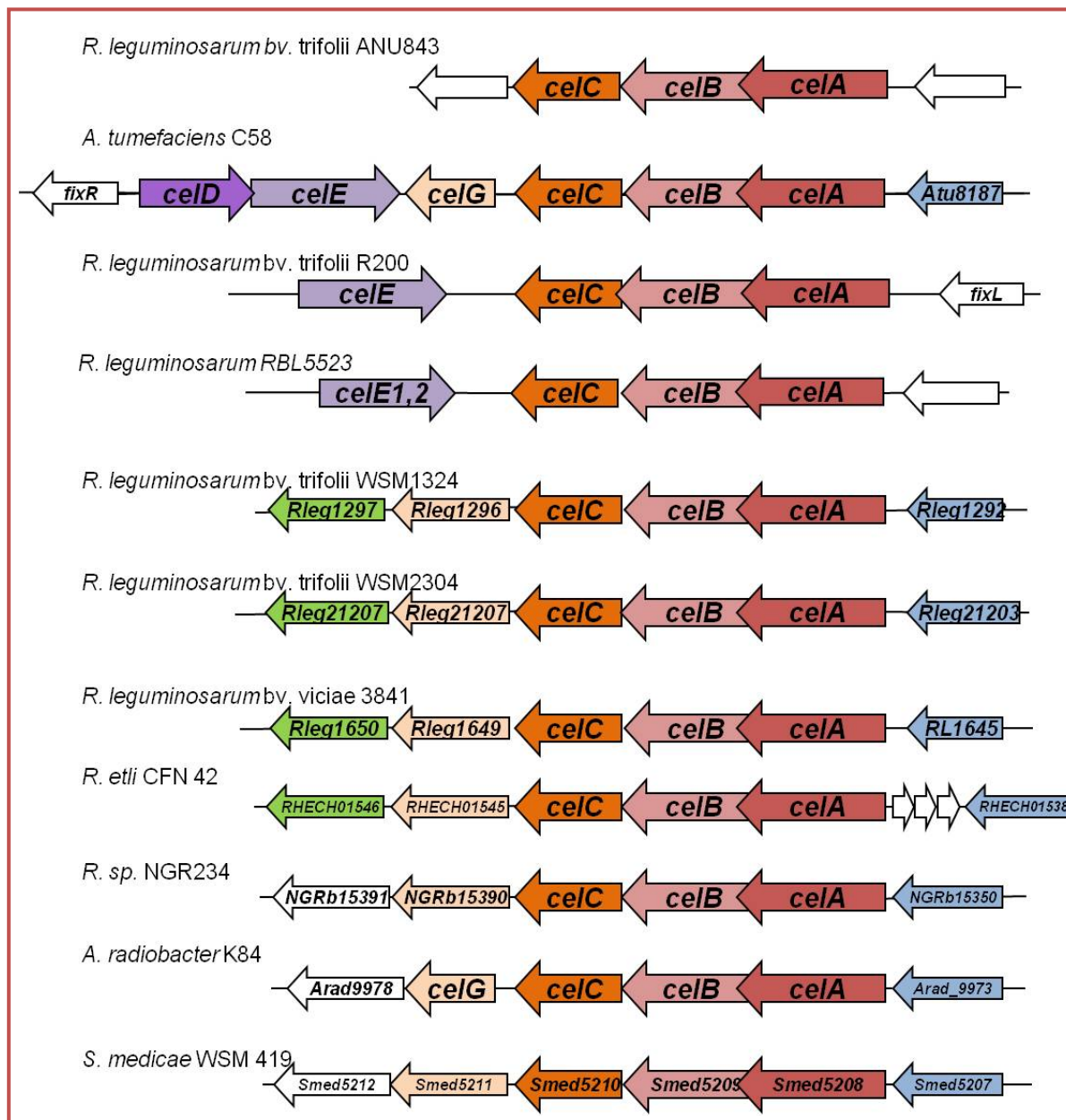


Figura 38. Mapa genético de la región de operones *celABC* (confirmados o hipotéticos) en distintas bacterias de la familia *Rhizobiaceae*. Los marcos de lectura abierta encontrados que codifican genes homólogos según una búsqueda con el programa BLAST, están representados con el mismo color. En aquellos representados en azul y verde, no se ha descrito su participación en la biosíntesis de celulosa. En blanco, genes desconocidos (sin nombrar) o que no presentaron homología con otros genes de esta región. Los “ORFs” no están dibujados a escala en todos los casos.

En la zona “aguas abajo” del marco de lectura abierta que presenta homología con el *celG* descrito para *Agrobacterium tumefaciens*, se encuentra otro gen de función desconocida que presenta homología entre las cepas de *R. leguminosarum* y *R. etli* cuyo genoma se encuentra secuenciado, pero no con las demás (Figura 38, representada en verde). Por último, la zona “aguas arriba” del gen *celA* se encuentra a su vez flanqueada por un ORF que codifica una proteína cuya función no ha sido aún identificada (Figura 38, representada en azul). Sin

embargo, su secuencia es homóloga en todos los organismos cuyo genoma está secuenciado y que se transcribe en la misma dirección que el operón *celABC*.

Por otro lado, Ausmees y colaboradores en 1999 encontraron por mutación con Tn5 en *R. leguminosarum* bv. trifolii R200, además de los genes estructurales *celABCE*, otros genes descritos como reguladores de dos componentes (*celR1* y *celR2*), organizados también en un operón y que son necesarios conjuntamente para la producción de celulosa. Una búsqueda y comparación de estos genes con las bases de datos disponibles actualmente reveló que existen homólogos a *celR1R2* en todos los rhizobia, independientemente de que posean el operón *celABC*. Además, en todos los casos codifican proteínas que parecen estar implicadas en mecanismos de transducción de señales y comparten la misma estructura. Sin embargo, en ningún caso fueron localizados cerca de los genes *celABC* como se había observado en la cepa R200.

La búsqueda en las bases de datos concluyó que todos los genomas disponibles actualmente de organismos de la familia *Rhizobiaceae* poseen genes que codifican para celulosa sintetasas que pertenecen a las glicosiltransferasas. Curiosamente, en todos los casos estos genes se encuentran bien cerca de endoglucanasas homólogas al gen *celC* (perteneciente a la familia 8 de las glicosil hidrolasas) formando el operón *celABC* descrito previamente, o bien cerca de genes que codifican para otras celulasas de la familia 26 de las glicosil hidrolasas formando un operón que contiene una posible celulosa sintetasa asociada con una celulasa y una proteína con función hipotética o desconocida. Por ello, hemos denominado a este posible operón de biosíntesis de celulosa *celIJK*, comprobando que presenta homólogos en todos los genomas bacterianos completos o en proceso de secuenciación disponibles pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium* (Tabla 23).

Por tanto, la mayoría de organismos comparten al menos estos dos tipos de operones de producción de celulosa, e incluso en *Agrobacterium tumefaciens* C58, los operones *celABC* y *celIJK* se sitúan muy próximos en el genoma, con solo dos marcos de lectura abierta de separación (Tabla 23). En otros genomas ya secuenciados de bacterias fijadoras de nitrógeno como *Mesorhizobium loti* y *Sinorhizobium meliloti* 1021 no se han localizado el operón *celABC* pero sí el otro posible operón que contiene una celulasa asociada a una celulosa sintetasa junto con una hipotética proteína con función desconocida que denominamos *celIJK*.

No obstante, la mayoría de las proteínas están descritas como “de función hipotética” en los genomas bacterianos anotados actualmente, por lo que no se puede descartar la existencia de más glicosiltransferasas e incluso de endoglucanasas pertenecientes a distintas familias. Por otro lado, parece bastante claro que el patrón que sigue la localización de las secuencias que codifican estas proteínas es la presencia de una glicosiltransferasa (GT2) posiblemente asociada a una glicosil hidrolasa formando un operón de biosíntesis de celulosa.

Tabla 23. Posibles operones relacionados con la biosíntesis de celulosa localizados en el genoma de los rizobios secuenciados. Los operones denominados *celIJK* (denominación propia) son aquellos formados por una glicosil transferasa, una proteína de función desconocida (como *CelB*) y una glicosil hidrolasa de la familia 26. *Datos obtenidos de GenBank.

| ORGANISMO | OPERÓN | LOCALIZACIÓN* |
|---|---------------|---|
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM1325 | <i>celABC</i> | <i>Rleg1293, Rleg1294, Rleg1295</i> |
| | <i>celIJK</i> | <i>Rleg43342, Rleg43343, Rleg4334</i> |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM2304 | <i>celABC</i> | <i>Rleg21204, Rleg21205, Rleg21206</i> |
| | <i>celIJK</i> | <i>Rleg24003, Rleg24004, Rleg24005</i> |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 3841 | <i>celABC</i> | <i>RL1646, RL1647, RL1648</i> |
| | <i>celIJK</i> | <i>RL0079, RL0080, RL0081</i> |
| <i>Rhizobium etli</i> CFN42 | <i>celABC</i> | <i>RHECH01542, RHECH01543, RHECH01544</i> |
| | <i>celIJK</i> | <i>RHECH00070, RHECH00071, RHECH00072</i> |
| <i>Rhizobium etli</i> CIAT 652 | <i>celABC</i> | <i>RHECIATCH0001610, RHECIATCH0001611, RHECIATCH0001612</i> |
| | <i>celIJK</i> | <i>RHECIATCH0000074, RHECIATCH0000075, RHECIATCH0000076</i> |
| <i>Rhizobium</i> sp. NGR234 | <i>celABC</i> | <i>NGRb15360, NGRb15370, NGRb15380</i> |
| | <i>celIJK</i> | <i>NGRb17870, NGRb17890, NGRb17880</i> |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 | <i>celABC</i> | <i>ATU3309, ATU08, ATU3307</i> |
| | <i>celIJK</i> | <i>ATU3314, ATU3313, ATU3312</i> |
| <i>Agrobacterium radiobacter</i> K84 | <i>celABC</i> | <i>Arad9974, Arad9975, Arad9976</i> |
| | <i>celIJK</i> | <i>Arad7615, Arad7617, Arad7618</i> |
| <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 | <i>celIJK</i> | <i>SMb20460, SMb20461, SMb20462</i> |
| <i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419 | <i>celABC</i> | <i>Smed5208, Smed5209, Smed5210</i> |
| | <i>celIJK</i> | <i>Smed3671, Smed3670, Smed3669</i> |
| <i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099 | <i>celIKJ</i> | <i>mll7871, mll7872, mll7873</i> |

La detección de un polímero que se une específicamente al Rojo Congo en todos los organismos que nodulan leguminosas y el hecho de que existan genes que codifican para proteínas con función celulosa sintetasa en la mayoría de los genomas de los rizobios secuenciados, parece indicar que la capacidad de sintetizar celulosa es bastante común entre estas bacterias. Por otra parte, la localización de un gen que codifica para una glicosil hidrolasa cerca de glicosil transferasas en todos los casos, junto con el alto grado de conservación del operón *celABC* dentro de la familia *Rhizobiaceae* y del gen *celC* entre las especies estudiadas del género *Rhizobium*, sugieren que la participación de una celulasa en el proceso de biosíntesis de celulosa es una característica bastante conservada entre estas especies.

CAPÍTULO II:

Análisis funcional del gen celC mediante la obtención de mutantes knock-out



CAPÍTULO II: ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN *celC* (I): PROCESO DE INFECCIÓN PRIMARIA

Nuestro siguiente objetivo era comprobar definitivamente la función en el proceso de entrada de la bacteria en las raíces de trébol (infección primaria) de la celulasa CelC2 (se mantendrá esta notación para referirnos al enzima codificado por la celulasa *celC* de nuestra cepa de estudio para diferenciarlo de la otra celulasa que se detecta en los zimogramas). Para ello, era necesaria la obtención de mutantes no productores del enzima con el fin de analizar su capacidad infectiva y compararla con la de la cepa silvestre de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843.

1. OBTENCIÓN DE LA CEPA MUTANTE *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 Δ C2

Antes de proceder a diseñar la estrategia que iba a llevarse a cabo para la obtención de mutantes defectivos del gen *celC*, era necesario conocer si este gen presentaba más de una copia en el genoma de la bacteria.

1.1. Determinación del número de copias del gen *celC*

Para determinar el número de copias del gen *celC* que presentaba en su genoma la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 se procedió a realizar un estudio de hibridación “Southern Blot” utilizando como sonda la obtenida al amplificar la secuencia clonada en el plásmido pPMC2 con los “primers” C1F y C2R. Esta sonda presenta un único sitio de restricción del enzima *HindIII* y no presenta ningún lugar de corte para el enzima *Sall* (Figura 39). Estos enzimas fueron empleados para llevar a cabo la digestión del ADN genómico de la cepa de estudio y de la cepa *Sinorhizobium meliloti* 1021, que se usó como control negativo, ya que su genoma está secuenciado y carece de dicho gen.

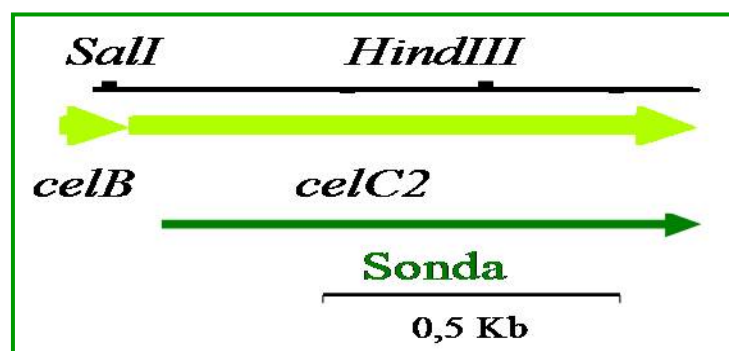


Figura 39. Mapa de restricción de la sonda empleada para la hibridación.

La hibridación de los fragmentos digeridos sometidos a electroforesis con la sonda sintetizada permitió la detección del gen *celC*. La hibridación se realizó a 42 °C, dando como resultado la ausencia de señal en las digestiones del control negativo y una y dos bandas con las digestiones *Sall* y *HindIII*, respectivamente del ADN genómico de la cepa ANU843 (Figura 40).

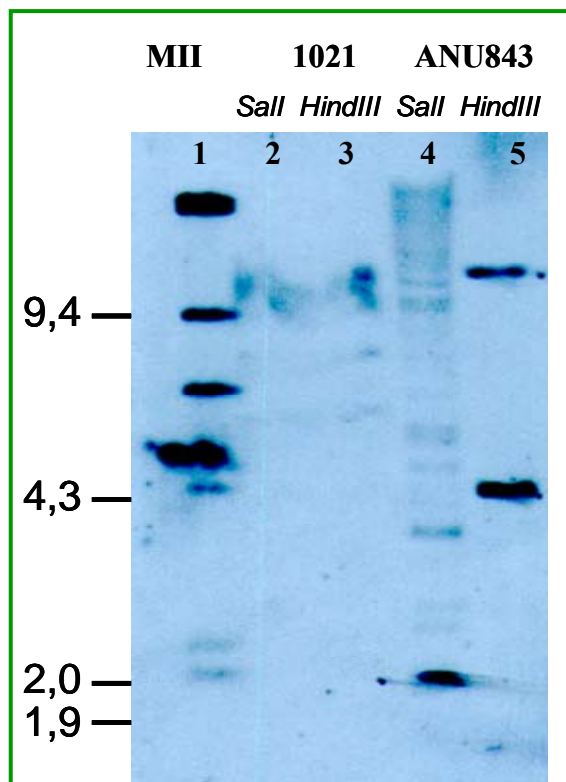


Figura 40. Comprobación del número de copias del gen *celC* mediante hibridación tipo “Southern Blot”. Los carriles 2 y 3 corresponden al ADN genómico de *S. meliloti* 1021 digerido con *Sall* y *HindIII* respectivamente. Los carriles 4 y 5 muestran la digestión con esas enzimas del ADN genómico de la cepa ANU843 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Se incluyó el marcador II en el carril I, los tamaños de las bandas resultantes se muestran en Kilobases.

Este resultado confirma la existencia de una sola copia del gen *celC* en su fondo cromosómico y es importante para abordar el siguiente objetivo. También nos confirma que en el fondo genético de la cepa *Sinorhizobium meliloti* 1021, utilizada como control en este experimento (carriles 2 y 3), no existen homólogos a este gen, tal y como se deduce de la búsqueda mediante el programa BLAST en su genoma, actualmente secuenciado por completo.

Por tanto, para la obtención de los mutantes knock-out del gen *celC* se decidió utilizar la técnica basada en la doble recombinación homóloga para la sustitución del gen original por una copia inactiva resultante de la escisión de un fragmento interno. Este método presenta la ventaja de que no inserta ningún fragmento marcador en el fondo genético de la bacteria que pueda producir fenotipos inesperados en las cepas mutantes obtenidas ni efectos pleiotrópicos en la expresión de otros genes.

1.2. Interrupción del gen *celC* y clonación en un plásmido suicida

Para la obtención de la cepa mutante se utilizó la técnica de mutagénesis dirigida utilizando el plásmido *pk18mobsacB* (Schafer *et al.*, 1994). Para ello, el fragmento clonado en el plásmido *pPMC2* que contiene el gen *celC* fue interrumpido gracias a la existencia de dos secuencias únicas de corte para los enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*, que permiten eliminar un fragmento del gen que contiene la zona que codifica el centro catalítico del enzima (Figura 41). El fragmento eliminado corresponde a unos 130 aminoácidos situados entre la posición 106 y 235 del enzima.

```

MRRWRALLLAASVAVAPGLPATAQQAMINADAWSAYKAKFLDP
SGRIVDNGNGNISHSEGQGYGLLLAYLSASPADFEQIWYFTRTELLLRDDG
LAVWKWDPNVKPHVADTNNATDGDMLIAYALALAGTAWKREDYILAA
SRMAQALLAETVGSSQGRTLLMPGTEGFTGSDRDDGPVVNPSYWIYEAI
VMAALAPSDAWKKLSDDGVELLKTMQFGPRKLP AEWVSLHDKPRPAEG
FDAEFGYNAIRIPLYLARGGITDKALLVRLQKGM SQDGPATIDLT TGRPK
TVLSDPGYRIVNDVVACVVDGTRL PSSALQFAPALYYPSTLQLLGLAYIGE
KHPECL

```

Figura 41. Secuencia de aminoácidos de la proteína *CelC2*. Se muestra el fragmento cortado por digestión con los enzimas *BamHI* y *HindIII* (verde). En rojo se resalta la secuencia consenso de las GH8 para el centro catalítico del enzima, incluido dentro del fragmento eliminado. También aparece señalado en azul la secuencia correspondiente al péptido señal.

Tras la digestión con estos enzimas se llevó a cabo la recircularización del plásmido utilizando la polimerasa “*Klenow*” para la obtención de extremos romos y la ligasa T4 para unirlos (Figura 43). El plásmido obtenido fue utilizado para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α , que fueron seleccionadas en medio LB con ampicilina. A los clones resultantes se les extrajo el ADN plasmídico y se comprobó por digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa la presencia del plásmido; el clon correcto se denominó *pPM Δ C2*. El corte correcto del fragmento interno del gen también se confirmó mediante secuenciación (datos no mostrados). Posteriormente se comprobó mediante ensayo en placa la ausencia de un halo de actividad celulásica en las cepas resultantes (Figura 42).

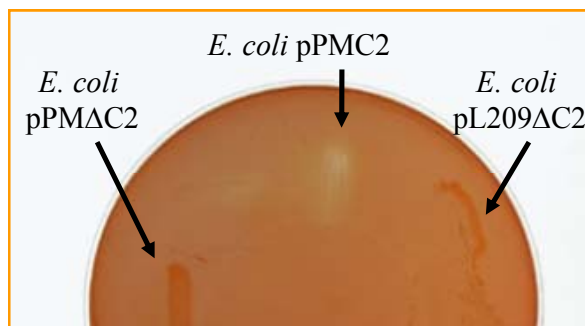
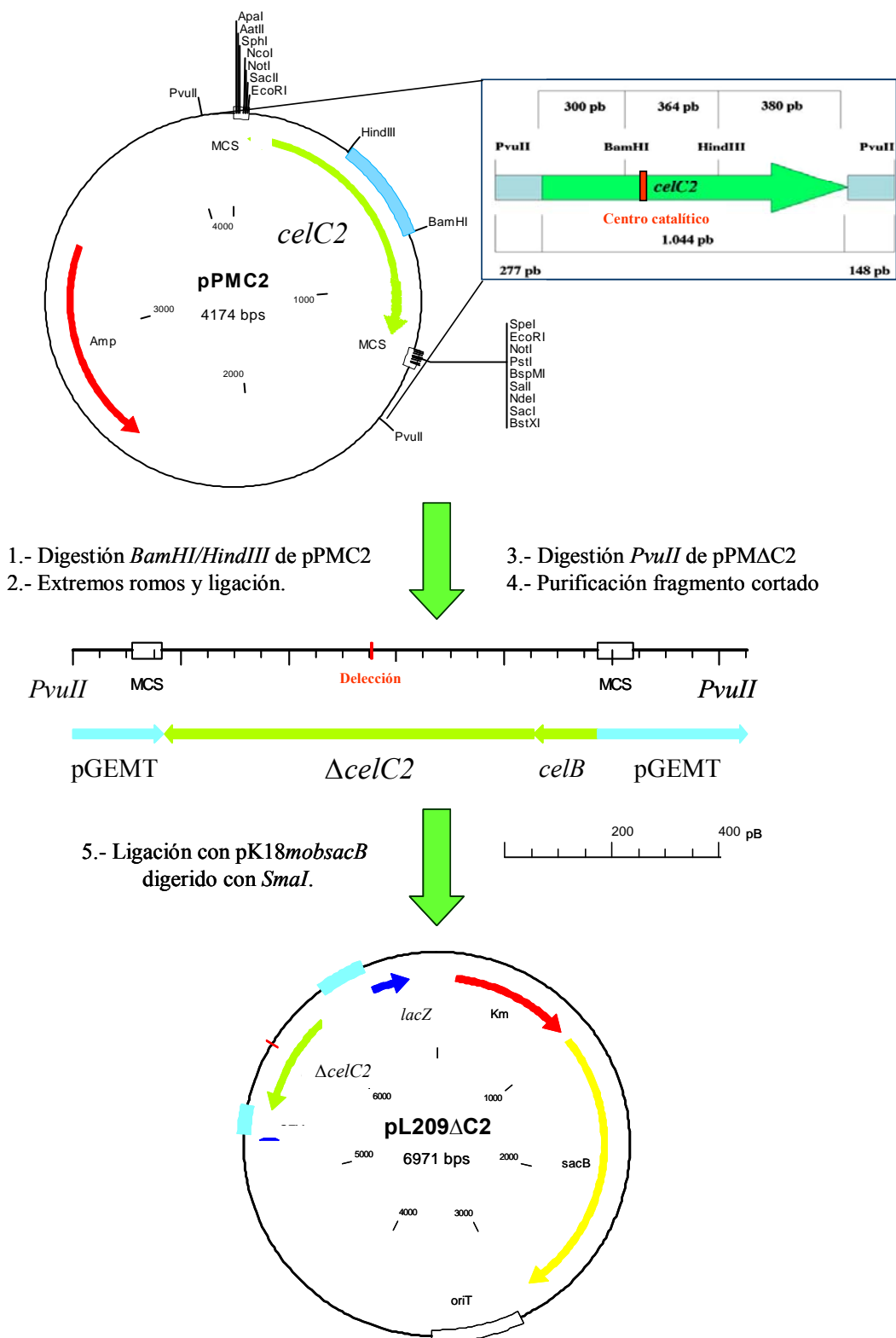


Figura 42. Ensayo de detección de actividad celulolítica en placa de las cepas de *E. coli* DH5 α transformadas con los plásmidos *pPM Δ C2*, *pPMC2* y *pL209 Δ C2* respectivamente.



Posteriormente, el gen interrumpido $\Delta celC$ fue extraído del vector pPM $\Delta C2$ mediante digestión con el enzima *PvuII* y ligado al plásmido suicida *pk18mobsacB* cortado con *SmaI* (Figura 43). La construcción obtenida fue utilizada para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α , que fueron seleccionadas en medio LB con kanamicina. A los clones resultantes se les extrajo el ADN plasmídico y se comprobaron por digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa. Los enzimas utilizados durante la estrategia de clonación (*PvuII* y *SmaI*) generan extremos romos, por lo que además se comprobó mediante digestión con *Sall*, que presenta dos sitios de restricción dentro del fragmento clonado y uno en el *polilinker* del plásmido, que la dirección de la inserción en el plásmido era la adecuada (datos no mostrados). Así, el clon correcto se denominó pL209 $\Delta C2$ (Figura 43) y se confirmó finalmente mediante un ensayo de actividad celulolítica en placa (Figura 42).

Los resultados muestran que la cepa de *E. coli* DH5 α que contiene el gen *celC* (*E. coli* pPMC2) es capaz de expresar dicho gen y producir la celulasa C2, ya que se observa un halo alrededor de la zona de crecimiento de las colonias. En el resto de construcciones (*E. coli* pPM $\Delta C2$ y pL209 $\Delta C2$) no se detecta dicha actividad enzimática lo que confirma que contienen el gen interrumpido y que este expresa una proteína sin actividad celulásica (Figura 42).

1.3. Transformación y selección de intercambio alélico

La construcción obtenida se utilizó para transformar *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843 por conjugación triparental (*ver materiales y métodos, apartado 4.2.1*). El plásmido empleado sólo se replica en *E. coli* y contiene dos marcadores que confieren resistencia a Kanamicina y sensibilidad a sacarosa respectivamente. Los transformantes que por una recombinación (intercambio alélico) simple habían integrado el plásmido en su cromosoma se seleccionaron mediante crecimiento en medio YMA con el antibiótico km, comprobando al mismo tiempo su incapacidad de crecer en presencia de sacarosa.

Uno de estos clones fue seleccionado y a esta cepa, denominada ANU843 β , se le extrajo el ADN genómico para comprobar la inserción mediante PCR. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos C1F y C2R que generaron un fragmento correspondiente al gen silvestre y otro del gen interrumpido, con una longitud de 364 pares de bases inferior (Figura 44).

A continuación, entre estas cepas se seleccionaron aquellas que por escisión del plásmido habían recuperado la capacidad de crecer en sacarosa y volvían a ser sensibles a kanamicina. Para determinar si había ocurrido el fenómeno de reemplazamiento génico y cuáles habían sustituido por doble recombinación homóloga el gen *celC* por el $\Delta celC$, distinguiéndolas de aquellas que habían recuperado el genotipo silvestre, se extrajo su ADN genómico y fueron sometidas de nuevo a PCR con los mismos “primers”. De esta forma se pudo seleccionar una cepa en la que únicamente se amplificaba la banda correspondiente al gen interrumpido, dando lugar al mutante ANU843 $\Delta C2$ (Figura 44). La cepa obtenida fue posteriormente comprobada mediante distintos ensayos de actividad enzimática (Figuras 46, 47 y 48).

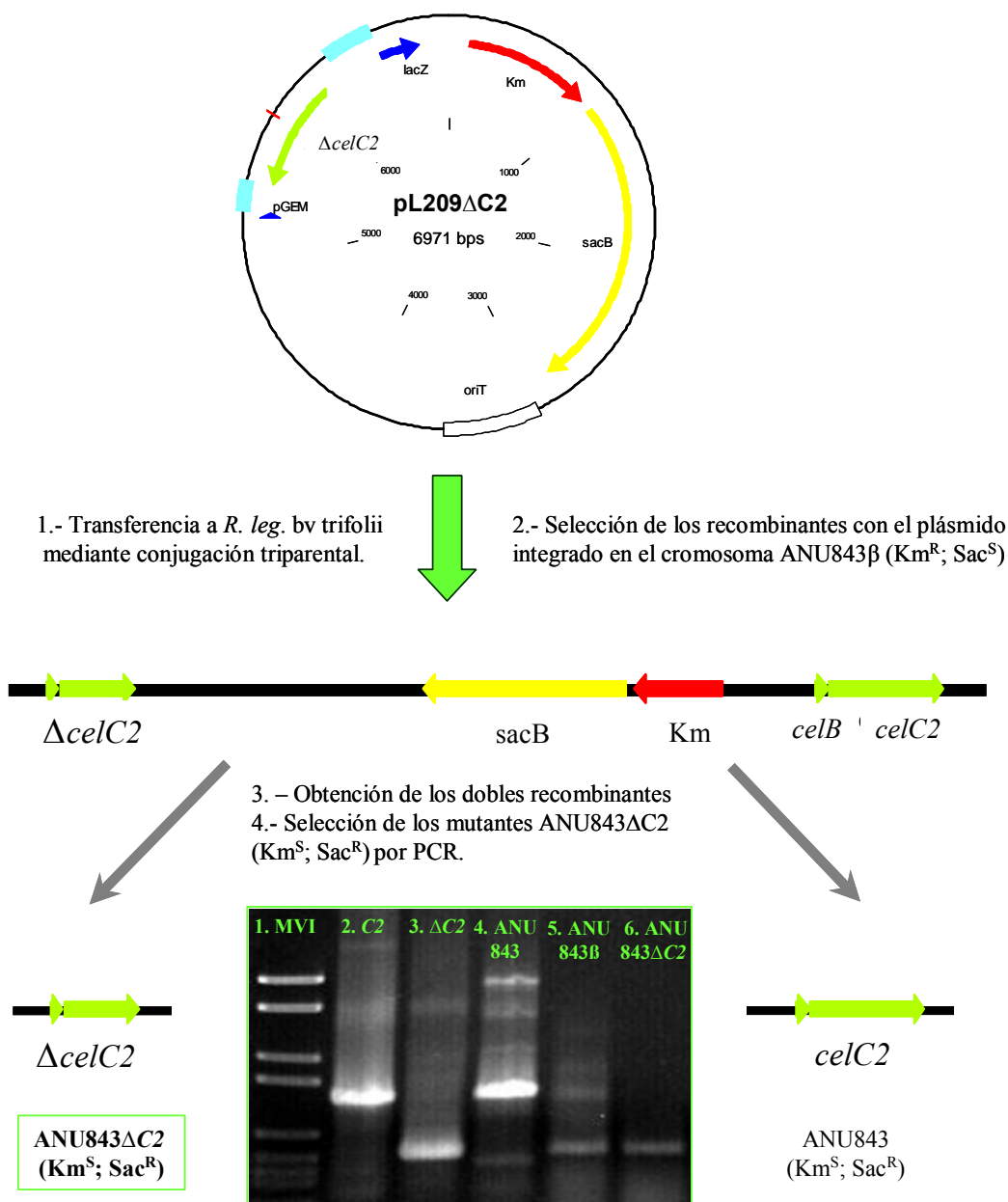


Figura 44. Reemplazamiento génico del gen *celC* y comprobación de la integración homóloga mediante PCR. Esquema del evento de doble intercambio alélico para que se produzca el reemplazamiento génico entre el gen *celC* (representado en verde), de 1044 pb, y el fragmento de 680 pb $\Delta celC$ integrado en el plásmido pK18*mobsacB*. La PCR se llevó a cabo utilizando los “primers” C1F y C2R para seleccionar los transformantes en los que ha ocurrido la integración homóloga. Los carriles 2-3 corresponden al ADN plasmídico procedente de las cepas *E. coli* pPMC2 y pPMA $\Delta C2$ respectivamente y el carril 4 a la cepa silvestre (ANU843). ANU843B es la cepa transformante que presentan tanto una copia silvestre del gen *celC* como una copia interrumpida. ANU843 $\Delta C2$, es el mutante que únicamente presenta el gen cortado que se obtiene tras el doble intercambio alélico, en el que el tamaño de la región amplificada es aproximadamente 364 pb inferior respecto al gen *celC* de la cepa silvestre. Se incluye el marcador MVI en el carril 1 cuyos tamaños de banda son 2176, 1760, 1230, 1033, 653, 517, 453, y 394 pb.

2. COMPLEMENTACIÓN DE LA CEPA MUTANTE

Para comprobar la implicación del gen *celC* de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ANU843 en el proceso de infección, además, se llevó a cabo la complementación de la cepa mutante obtenida en el apartado anterior mediante la transformación con un vector estable que expresa constitutivamente el gen de estudio.

Para ello, el plásmido pPMC2 fue digerido con *Sall* obteniendo un fragmento que contiene el gen *celC*. Este fragmento fue purificado y ligado al sitio *XhoI/Sall* de pBBR1MCS-2 obteniendo el vector pJZC2 (Figura 45). Esta construcción se empleó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α que, a su vez, se utilizaron como cepas donadoras en cruces triparentales con la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ANU843 Δ C2, para posteriormente seleccionar aquellos transformantes que eran resistentes a kanamicina.

A continuación se confirmaron los exconjugantes mediante la extracción de ADN para comprobar la presencia del gen *celC* mediante PCR. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos C1F y C2R que generaron un fragmento correspondiente al gen silvestre y otro del gen cortado, con una longitud 364 pares de bases inferior (Figura 45).

De esta manera se seleccionó una de estas cepas que posee el gen cortado en su cromosoma y el gen silvestre en el plásmido pJZC2, que fue denominada ANU843 Δ C2comp. Posteriormente, esta cepa fue sometida a distintos ensayos de actividad enzimática para comprobar la restauración de la capacidad de producción de actividad carboximetilcelulásica correspondiente a la celulasa *celC*.

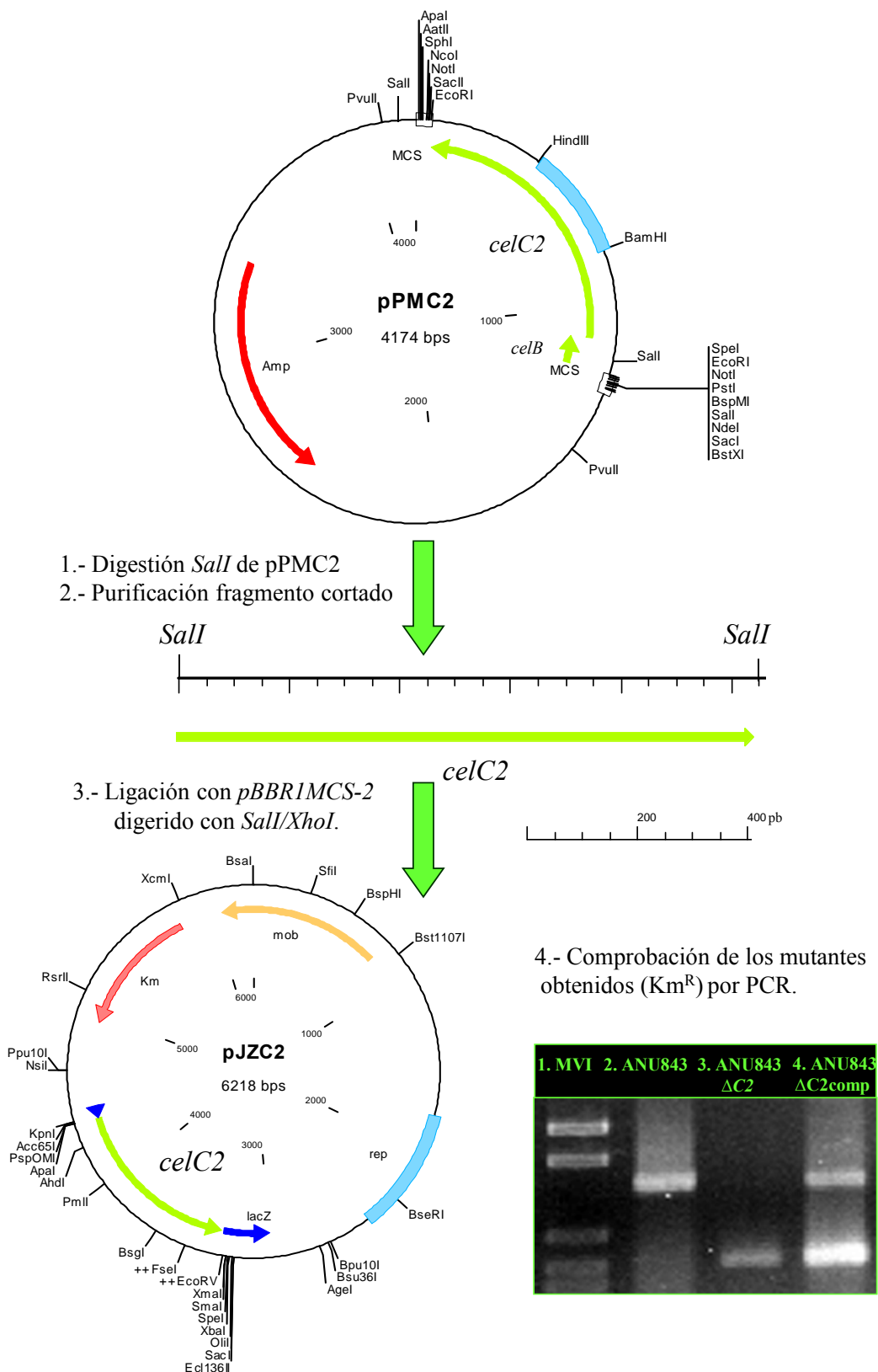


Figura 45. Estrategia para la construcción del plásmido pJZC2 y comprobación de la complementación mediante PCR. La PCR se llevó a cabo utilizando los “primers” C1F y C2R, el carril 2 corresponde a la cepa silvestre (ANU843), ANU843 $\Delta celC2$ (carril 3) es el mutante que presenta el gen cortado y ANU843 $\Delta C2comp$ es la cepa complementada (carril 4). Se incluye el marcador MVI en el carril 1 cuyos tamaños de banda son 2176, 1760, 1230, 1033, 653, 517, 453 y 394 pb.

3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS OBTENIDAS

3.1. Actividad celulolítica

Como ya se ha comentado anteriormente en esta memoria, la puesta a punto en nuestro laboratorio de técnicas de detección de actividad celulolítica con los mismos fundamentos teóricos que las descritas, pero mejoradas en su sensibilidad, permitió la detección de actividad en los casos en que inicialmente no había sido posible. Se optimizaron tanto las técnicas de detección cualitativa en placa como las que permiten la detección de isoenzimas con actividad celulolítica en extractos celulares de diversas cepas del género *Rhizobium*, tras su separación mediante electroforesis en condiciones semidesnaturalizantes (Mateos *et al.*, 1992); y técnicas de cuantificación de forma indirecta, valorando los grupos reductores producto de la hidrólisis de los sustratos polisacarídicos (Green *et al.*, 1989).

Estos ensayos se llevaron a cabo con la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ANU843, en cuyos extractos celulares había sido posible la detección de actividad tanto pectinolítica como celulolítica (Jiménez-Zurdo *et al.*, 1996a; Mateos *et al.*, 1992). Como sustrato se empleó un derivado soluble de celulosa, la carboximetil celulosa sódica de viscosidad media (CMC), para valorar actividad 1,4- β -D-glucanohidrolásica. Los ensayos permitieron la valoración de la actividad en el rango nanomolar, sensibilidad 1000 veces mayor que la demostrada por los métodos tradicionales anteriormente mencionados.

Estos métodos se describen en la sección de materiales y métodos ya que, por todo lo expuesto, fueron los utilizados para determinar cualitativa y cuantitativamente la actividad celulolítica de la cepa silvestre y los mutantes obtenidos en este trabajo. Para ello, se realizaron ensayos de actividad celulolítica en colonias, de difusión radial en placa, electroforesis con posterior revelado de actividad (zimograma) y valoración de azúcares reductores, para comprobar fenotípicamente el efecto de la mutación en el gen *celC* en la cepa ANU843 Δ C2 y de su complementación en la cepa ANU843 Δ C2comp.

Todos estos ensayos, excepto el de determinación directa en colonias, se llevaron a cabo tamponando la reacción a pH 5 y sometiéndola a incubación a una temperatura de 40 °C, condiciones óptimas para la hidrólisis del sustrato, carboximetilcelulosa por parte del enzima de estudio. En todos los ensayos se utilizaron como controles negativos de actividad, agua estéril o tampón según la solución en la que se encontraran las muestras, no detectándose en ninguno de estos casos, tras la tinción del sustrato, zonas claras que por error pudieran atribuirse a una hidrólisis enzimática que diera lugar a falsos positivos.

3.1.1. Ensayo en colonias

Como una primera aproximación, se llevó a cabo la determinación de la actividad celulolítica de las colonias tanto de la cepa silvestre ANU843 como de los mutantes obtenidos ANU843 Δ C2 y ANU843 Δ C2comp, tal y como se describe en el apartado correspondiente de materiales y métodos. Mediante este ensayo se puede observar cómo la actividad celulolítica permanece asociada a las células ya que es únicamente alrededor de la zona donde se observa el crecimiento bacteriano donde puede apreciarse un halo correspondiente a la degradación de la CMC presente en el medio tras el revelado.

Pese a ser un ensayo sin valor cuantitativo, permite observar cualitativamente la existencia o no de actividad celulolítica en las cepas sometidas al estudio y establecer diferencias de la intensidad entre los halos de hidrólisis detectados. Así, se pudo observar cómo la cepa silvestre produce un halo de actividad similar al de la complementada y, sin embargo, la cepa mutante ANU843 Δ C2 produce un halo muy inferior (Figura 46).

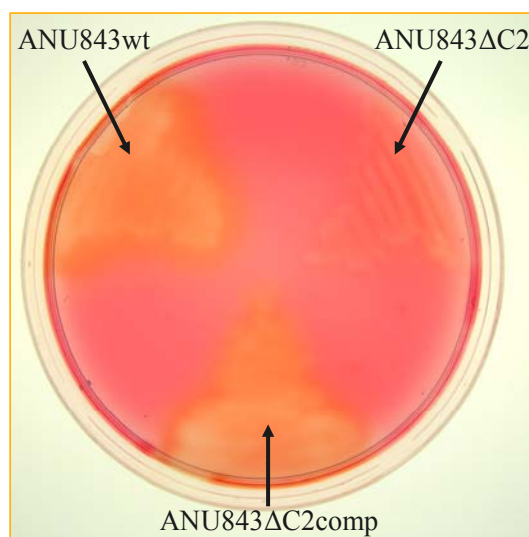


Figura 46. Ensayo de actividad carboximetilcelulásica en colonias de la cepa silvestre *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 y los mutantes ANU843 Δ C2 y ANU843 Δ C2comp.

Debido a que la cepa silvestre *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* ANU843 produce dos isoenzimas con actividad celulolítica, denominadas C1 y C2, la actividad correspondiente al halo de hidrólisis observado en el mutante ANU843 Δ C2 podría deberse únicamente a la presencia de la celulasa C1. Este hecho podrá comprobarse mediante la electroforesis de las proteínas y su posterior revelado de actividad. En ese caso, podría afirmarse que la celulasa C1 presenta una capacidad hidrolítica aparentemente inferior a la producida por su isoenzima C2 en las condiciones de estudio empleadas, ya que el halo de hidrólisis observado en el mutante es considerablemente más pequeño que el que puede apreciarse en la cepa silvestre que produce ambas enzimas simultáneamente.

3.1.2. Ensayo de difusión en placa

Mediante el ensayo de difusión radial en placa fue detectada actividad celulolítica en extractos obtenidos por sonicación de cultivos de las cepas estudiadas (Figura 47). Sin embargo, los resultados fueron siempre negativos cuando se utilizaron como soluciones enzimáticas las fracciones extracelulares (sobrenadantes de cultivo) de las mismas (datos no mostrados). Por tanto, el procesamiento y localización de los enzimas hidrolíticos en las cepas recombinantes obtenidas no se ha visto alterado, permaneciendo unidos a la célula.

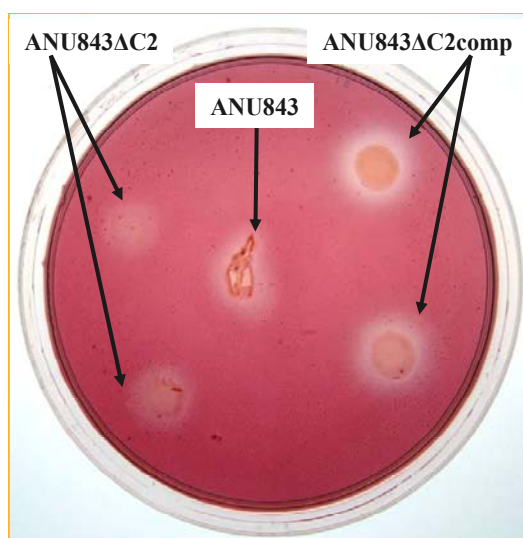


Figura 47. Detección de actividad celulolítica mediante difusión radial en placa en extractos celulares obtenidos por sonicación de la cepa silvestre *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843 (centro) y los mutantes ANU843ΔC2 (izquierda) y ANU843ΔC2comp (derecha).

Si bien este ensayo no tiene valor cuantitativo, sí permite observar diferencias en el diámetro e intensidad de los halos de hidrólisis detectados. Así, donde se depositaron los extractos obtenidos por sonicación a partir de la cepa mutante ANU843ΔC2, se puede observar cómo se formó un halo de hidrólisis de menor diámetro que el de la cepa silvestre y que el correspondiente a la cepa complementada, que fue la que presentó un diámetro e intensidad mayor. Estas diferencias podrán ser detectadas de manera más fiable con el ensayo cuantitativo (BCA) utilizando las mismas cepas, pero parece que concuerdan con los obtenidos en el ensayo anterior, en los que también se observó una actividad carboximetilcelulásica muy baja en la cepa que carece del gen *celC*.

3.1.3. Electroforesis en gels de poliacrilamida y zimograma

La construcción de la cepa mutante y su correcta complementación también se comprobaron mediante detección de la proteína CelC2 mediante zimograma. Las técnicas electroforéticas son las más utilizadas en la separación y estudio analítico de mezclas complejas de proteínas. La capacidad de difusión de

los enzimas celulolíticos a partir del gel utilizado en la electroforesis, hacia geles de agarosa en los que se incluye el sustrato, ha permitido la utilización de estas técnicas en el estudio de complejos sistemas celulolíticos bacterianos y fúngicos (Biely *et al.*, 1985), ya que, tras un periodo de incubación de ambos geles en las condiciones adecuadas, la tinción con Rojo Congo del sustrato no hidrolizado en el gel de agarosa permite la visualización de zonas claras que se corresponden con las celulasas separadas en el gel de poliacrilamida.

En este trabajo se han utilizado estas técnicas ya que son las que han permitido la detección de isoenzimas con actividad celulolítica en extractos celulares de diversas cepas del género *Rhizobium* (Jiménez-Zurdo *et al.*, 1996a; Mateos *et al.*, 1992), tras su separación mediante electroforesis en condiciones semidesnaturalizantes, como se describe en la sección de materiales y métodos. Así, se habían resuelto dos isoenzimas con actividad celulásica en extractos de la cepa silvestre ANU843 de masas moleculares aproximadamente 44500 y 31500 Daltons, que se denominaron C1 y C2.

Tras la separación electroforética en condiciones semidesnaturalizantes de las proteínas contenidas en las fracciones celulares obtenidas por sonicación de las cepas utilizadas en los experimentos, el gel de poliacrilamida fue sometido a incubación con un gel de agarosa que contenía CMC y, posteriormente, teñido con Rojo Congo para detectar la actividad celulolítica (Figura 48). Los resultados expuestos en la figura muestran que la cepa parental ANU843 (carril 1) y la cepa complementada ANU843 Δ C2comp (carril 3) desarrollaron el mismo perfil de bandas, aunque la banda inferior, correspondiente a la proteína CelC2, presentó mayor intensidad en la cepa complementada. Esta banda no se detectó en la cepa ANU843 Δ C2, por lo que se deduce que efectivamente el gen denominado *celC* se corresponde con la proteína CelC2 y que la construcción de la cepa mutante ha sido satisfactoria, ya que carece de la actividad correspondiente a este enzima.

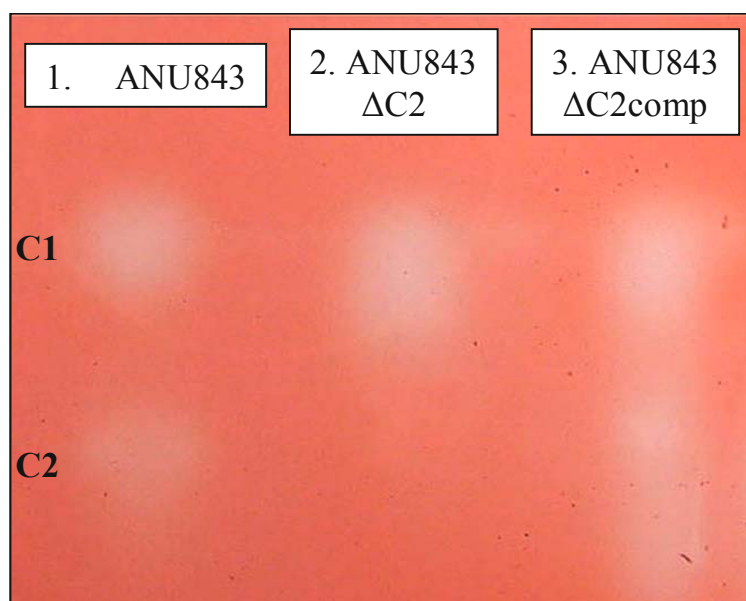


Figura 48. Zimograma sobre gel de agarosa-CMC para la detección de isoenzimas con actividad celulasa (C1 y C2) en extractos celulares de la cepa silvestre *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 (carril 1) y los mutantes ANU843 Δ C2 (carril 2) y ANU843 Δ C2comp (carril 3) después de su separación mediante SDS-PAGE.

También se puede asegurar que la cepa complementada restaura la capacidad de producir este enzima, aunque, como también se ha observado en los ensayos de detección de actividad celulolítica anteriores, esta actividad parece ligeramente superior a la de la cepa parental. La banda superior, que pudo detectarse en las tres cepas de estudio, corresponde a la proteína denominada CelC1, cuya actividad no se ve afectada por la inactivación ni complementación del gen *celC* en las cepas ANU843 Δ C2 y ANU843 Δ C2comp respectivamente.

3.1.4. Cuantificación de actividad celulolítica

Por último, se llevaron a cabo ensayos de detección de actividad celulolítica mediante la valoración de grupos reductores formados tras la hidrólisis del sustrato CMC ya que este ensayo, a diferencia de los anteriores, permite realizar estimaciones cuantitativas utilizando las mismas soluciones enzimáticas obtenidas por sonicación, como se describe en la sección de materiales y métodos.

Así, se llevaron a cabo estos ensayos con la cepa silvestre y los mutantes objeto de este estudio y los resultados obtenidos fueron transformados en unidades enzimáticas (U) (Figura 49). Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que libera un nmol del azúcar reductor equivalente (glucosa) por minuto a 40 °C y pH 5, en este caso utilizando como sustrato CMC. Los valores recogidos son la media de tres determinaciones en muestras obtenidas a partir de cultivos celulares sonicados.

Como puede observarse, la actividad enzimática detectada correspondiente a la cepa ANU843 Δ C2 fue prácticamente nula, en comparación con la de la cepa silvestre (0,15U frente a 1U aproximadamente) y cercana a los límites de detección de la técnica empleada. Por tanto, estamos en condiciones de afirmar que el menor rendimiento conseguido es debido a la ausencia de una copia activa del gen *celC* y por ello de actividad correspondiente al enzima CelC2. Además, estos resultados corroboran los obtenidos anteriormente utilizando otros métodos de detección de actividad, en los que esta cepa presentó un halo de hidrólisis enzimática menos intenso (ensayos en placa) y ausencia de actividad celulolítica correspondiente al enzima CelC2 (zimograma).

La detección de una pequeña cantidad de actividad enzimática en la cepa ANU843 Δ C2 puede corresponder al otro isoenzima (CelC1) que, como se ha podido observar, presenta menor actividad en las condiciones experimentales utilizadas. Esto puede ser debido a que el pH o la temperatura a los que se lleva a cabo la reacción para la detección del enzima CelC2 no sean los óptimos para determinar el otro isoenzima, pese a que en el zimograma ambos sean visualizados.

Por otro lado, la actividad residual correspondiente a esta cepa mutante incluso podría ser debida a algún otro enzima con actividad exoglucanásica, ya que este método detecta tanto enzimas celulolíticos con capacidad tanto endoglucanásica como exoglucanásica, pertenecientes a las familias de las 1,4-β-D glucano celobiohidrolasas (E.C. 3.2.1.91) y de las 1,4-β-D glucano glucohidrolasas (E.C. 3.2.1.74). Esto se debe a que ambos tipos de enzimas hidrolíticos actúan sobre el extremo no reductor terminal de las cadenas de celulosa liberando moléculas de celobiosa y glucosa, respectivamente, generando, de esta forma, al igual que las endoglucanasa, grupos reductores susceptibles de valoración.

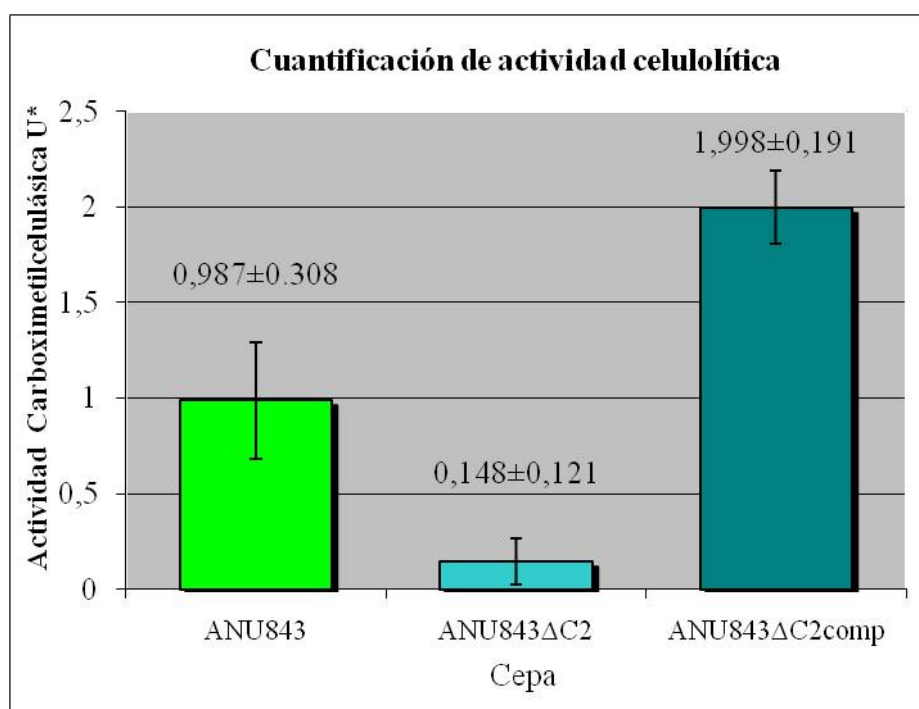


Figura 49. Actividad celulolítica en extractos celulares de la cepa silvestre *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843, el mutante knock-out del gen *celC* (ANU843ΔC2) y de la cepa complementada (ANU843ΔC2comp). Los datos corresponden a la media de al menos tres determinaciones independientes en las que en cada una se hicieron al menos tres medidas para cada tiempo y las barras de error representan la desviación estándar entre ellas. * Una unidad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que libera 1 nmol del azúcar reductor equivalente (glucosa) por min a 40 °C y pH 5,0.

Estos resultados nos permiten confirmar la restauración de la capacidad de producción de actividad celulolítica en la cepa complementada (ANU843ΔC2comp) mediante la transformación del mutante knock-out con un plásmido que contiene una copia del gen *celC*. Por tanto, se puede asegurar que este gen es el responsable del incremento de actividad con respecto a la cepa que tiene una copia del gen cortado (ANU843ΔC2) y que la actividad de esta cepa complementada es superior a la de la cepa silvestre. Este hecho puede ser debido a la integración de varias copias del plásmido pJZC2 en la cepa complementada o a que la tasa de expresión del gen *celC*, aunque en ambos casos sea constitutiva, sea mayor en la cepa complementada que en la silvestre.

3.2. Fenotipo simbiótico en *Trifolium repens*

Para comprobar si la actividad de la celulasa CelC2 está implicada en el proceso de infección de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii en trébol, comparamos los fenotipos simbióticos de la cepa silvestre ANU843 y de los mutantes ANU843 Δ C2 y ANU843 Δ C2comp mediante ensayos de infectividad y nodulación en cultivos monoxénicos y de producción en invernadero.

3.2.1. Ensayos de infectividad

Estos ensayos se llevaron a cabo inoculando plantas de trébol blanco (*Trifolium repens*) en placa con las cepas ANU843, ANU843 Δ C2 y ANU843 Δ C2comp, tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos. Las distintas etapas iniciales del proceso de infección fueron monitorizadas en las raíces de trébol a los pocos días de ser inoculadas mediante microscopía de contraste de fases.

3.2.1.1 Deformación de los pelos radicales e iniciación del primordio nodular (*Had/ Noi*)

Los pelos radicales de *Trifolium repens* inoculados tanto con la cepa silvestre ANU843 como con el mutante ANU843 Δ C2, sufrieron las deformaciones típicas que presentan habitualmente en presencia de un rizobio compatible (fenotipo *Had*), especialmente en aquellos presentes en la zona II de la raíz que son particularmente susceptibles de sufrir deformaciones (*ver apartado de la introducción*). A su vez, ambas cepas fueron capaces de inducir la formación de primordios nodulares en las raíces de la planta (fenotipo *Noi*) (Figura 50).

Estos eventos relacionados con las primeras etapas del proceso de infección incluso ocurren en las raíces de la planta en respuesta a los factores de nodulación cuando estos son añadidos en ausencia de la bacteria (Dazzo *et al.*, 1996; Gage, 2004; Limpens *et al.*, 2003), por tanto es lógico que se produzcan después de ser inoculados con ambas cepas. Estos resultados implican que la cepa mutante ANU843 Δ C2 no presenta ninguna alteración en la síntesis de los factores de nodulación compatibles con su planta hospedadora

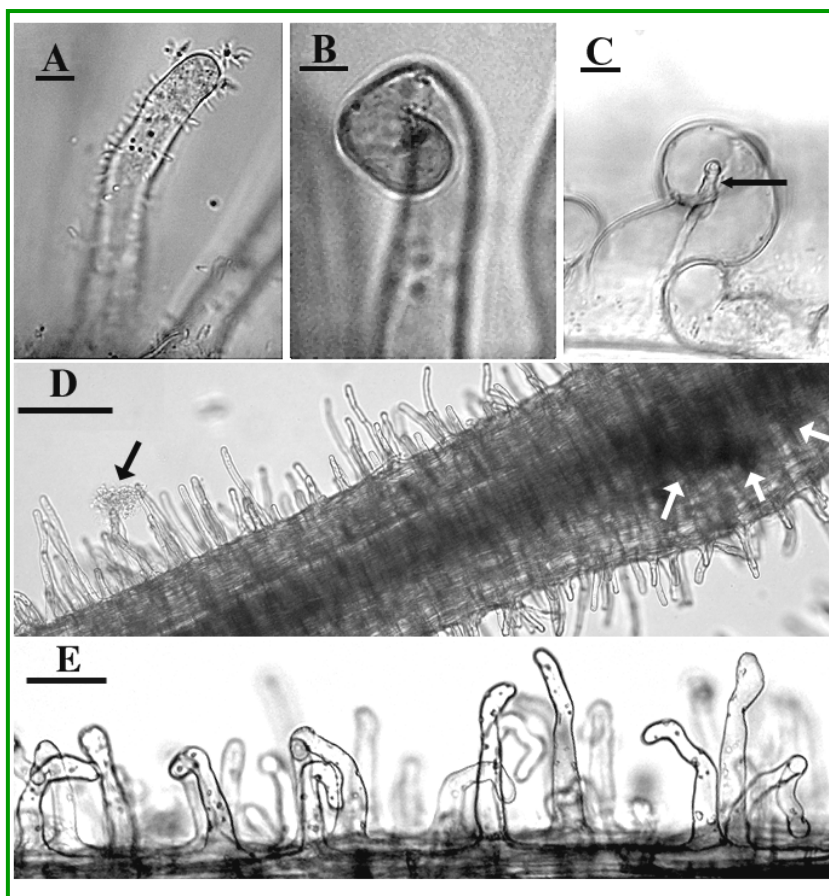


Figura 50. Sucesión de eventos relacionados con la infección primaria de plantas de trébol blanco inoculadas con la cepa silvestre ANU843 (A-C) y la cepa mutante ANU843ΔC2 (D, E). Las imágenes tomadas mediante microscopía de contraste de fases muestran los eventos de infección primaria canónicos que se suceden en *Trifolium repens* una vez inoculado con una cepa silvestre de *R. leguminosarum* bv. trifolii: adhesión a los pelos radicales (A), formación del “curling” y cayado de pastor (B, C) y del canal de infección (C, flecha). En la microfotografía D, mediante una flecha negra se señala cómo el mutante defectivo en la producción del enzima CelC2 también mostró la capacidad de adherirse a la punta de los pelos radicales y, señalado mediante flechas blancas, se puede observar que también induce la formación de primordios nodulares en la planta. Sin embargo, como muestran las imágenes D y E, aunque se induce la deformación de los pelos radicales, no se observó la formación de cayados de pastor ni de canales de infección en ellos. Escalas 15 μm (A, B, C), 50 μm (E) y 100 μm (D).

3.2.1.2 Adhesión y curvatura del pelo radical (Roa/Hac)

Tanto en la cepa silvestre ANU843 (Figura 50 A) como en el mutante ANU843ΔC2 (Figura 50 D) se pudo apreciar la adhesión de las bacterias a la superficie de la raíz y a los pelos radicales (fenotipo Roa). Este resultado presenta una gran relevancia ya que pone de manifiesto que la adhesión de los mutantes defectivos en el gen *celC* no se ve afectada pese a que este gen se encuentra formando parte del operón *celABC* involucrado en la biosíntesis de celulosa (Ausmees *et al.*, 1999; Matthyse *et al.*, 1995), uno de los compuestos implicados

a su vez en la adhesión de las bacterias a la planta, junto con ricadhesinas y lectinas.

Pese a que la celulosa no sea imprescindible en esta etapa, la posible implicación en su biosíntesis del gen *celC* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* permanece abierta, ya que el grupo de Ausmees *et al* (1999) no obtuvo ningún mutante en dicho gen. Este hecho pudo ser debido a que su método de selección de genes implicados en la biosíntesis de celulosa, basado en mutagénesis con Tn5 y screening de transformantes incapaces de sintetizar celulosa, no resultara en la selección de mutantes en el gen *celC* debido a que, como se tratará más ampliamente en el capítulo V, estos mutantes tienen incluso incrementada la producción de este polisacárido. No obstante, dicho fenotipo tampoco parece afectar a la capacidad de nodular de la cepa *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, ya que estos mismos autores también consiguen obtener mutantes que, por inserciones en dos genes reguladores denominados *celR1* y *R2*, producen gran cantidad de celulosa y, sin embargo, no se ve mermada su capacidad infectiva.

Por otro lado, mediante microscopía óptica se pudo observar como la cepa silvestre era capaz de inducir en los pelos radicales la deformación típica que conduce al desarrollo del cayado de pastor o “curling” completo (fenotipo Hac) (

Figura 50 D). Un estudio cuantitativo y detallado de estas raíces nos permitió hacer una estimación media del número de pelos radicales en los que aparecían estos fenómenos de “curling” en la cepa ANU843 (Tabla 24).

Tabla 24. Fenotipo simbiótico en las primeras etapas del proceso de infección de la cepa silvestre (ANU843) y el mutante knock-out (ANU843ΔC2) inoculados en trébol blanco. Los valores recogidos para cada uno de los fenotipos (Hac: hair curling, formación del cayado de pastor completo; Inf: infection thread, formación del canal de infección) muestran la media de al menos 4 plantas de cada experimento. Junto a cada valor aparece el error estándar de la media.

| FENOTIPO | CEPA INOCULADA | | |
|------------|----------------|-----------|--------------|
| | ANU843 | ANU843ΔC2 | NO INOCULADA |
| Hac/planta | 16.8 ± 1.7 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| Inf/planta | 13.8 ± 1.7 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |

Sin embargo, el mutante ANU843ΔC2 conservó la habilidad de inducir varios tipos de deformaciones de los pelos radicales (Figura 50 E), pero no indujo la formación de un completo y marcado “curling” ni canales de infección en las plantas de trébol en las que fue inoculado (Tabla 24). Este hecho puede ser debido a que la celulasa CelC2, capaz de hidrolizar la punta del pelo radical vegetal, también intervenga en la deformación completa del pelo radical.

Se han conseguido reproducir algunas de las respuestas de la planta en las primeras etapas del proceso de infección (fenotipo Had, Noi) mediante la adición de distintos factores de nodulación purificados, pero la deformación completa del pelo radical no ocurre en ningún caso en ausencia de la bacteria (Gage, 2004;

Limpens *et al.*, 2003). Por tanto, existen otras moléculas producidas por la bacteria que probablemente no son exportadas al exterior de la célula y que determinan que se forme esta estructura.

3.2.1.3 Penetración y formación del canal de infección (Hot/Inf)

Utilizando la misma técnica pudo apreciarse la formación del canal de infección (fenotipo Inf) en algunos pelos radicales de las raíces inoculadas con la cepa silvestre (Figura 50 C), signo claro de la capacidad de este microorganismo de atravesar la pared celular vegetal (fenotipo Hot) de la punta del pelo radical en algunos pelos una vez atrapado en la estructura de cayado de pastor. También se determinó el número medio de canales de infección que se localizaron por planta (Tabla 24).

Por su parte, en los distintos ensayos de infección llevados a cabo con el mutante ANU843 Δ C2, no se observó la presencia de esta estructura, lo que constituye una manifestación de la pérdida de su capacidad de penetrar en la planta. Un examen detallado mediante microscopía de contraste de fases de las plántulas inoculadas con el mutante ANU843 Δ C2 reveló dos eventos aislados en los que apareció un punto refráctil y brillante en los pelos radicales deformados. Este evento morfológico suele preceder a la penetración en el pelo radical y a la formación del canal de infección (Dazzo *et al.*, 1996). Por tanto, parece que esta cepa defectiva en la producción de la celulasa CelC2 aborta el proceso de infección en este punto de la penetración primaria de la pared celular vegetal, ya que no es capaz de hidrolizar la punta del pelo radical. Estos resultados concuerdan con los obtenidos al purificar la celulasa CelC2 y comprobar su efecto sobre las raíces de trébol, en los que se observaba la hidrólisis localizada de la punta del pelo radical.

Por último, la cepa complementada también siguió los pasos canónicos correspondientes al proceso de infección de la cepa silvestre en trébol blanco: adhesión a la punta de los pelos radicales (Roa), varios tipos de deformación de los pelos radicales (Had), curvatura de los mismos (Hac) y formación del canal de infección (Inf), aunque la producción de una mayor cantidad de la celulasa CelC2 parece producir una degradación excesiva de la punta del pelo radical, fenotipo que se abordará ampliamente en el siguiente capítulo. Así, se demuestra que una vez restaurada la capacidad de producir el enzima CelC2, el microorganismo también recupera su capacidad de entrar en la planta, reforzando la implicación de esta molécula en el proceso de infección.

3.2.2. Ensayos de nodulación

También se llevaron a cabo ensayos de nodulación inoculando plantas de trébol blanco (*Trifolium repens*) en un medio carente de nitrógeno con las cepas ANU843, ANU843 Δ C2 y ANU843 Δ C2comp tanto bajo condiciones monoxénicas como en cultivo en invernadero, tal y como se describe en el

apartado de materiales y métodos. Estos experimentos nos permitieron analizar algunos parámetros de la simbiosis como la cinética de nodulación durante el ensayo y comprobar la morfología de los nódulos y el desarrollo de las plantas al final del experimento en cada una de las cepas de este estudio.

3.2.2.1 Cinética de nodulación y morfología nodular (*Nod*)

Tal y como se había observado en los ensayos de infección, tanto la cepa silvestre ANU843 como los mutantes ANU843 Δ C2 y ANU843 Δ C2comp indujeron la formación de primordios nodulares en las plantas de trébol blanco. Los estudios de cinética de nodulación se llevaron a cabo mediante el recuento de nódulos cada 48 horas. Aproximadamente a los 10 días tras la inoculación, se pudo observar la aparición de los primeros nódulos en las plantas inoculadas con cada cepa (Figura 51). El número de nódulos aumentó progresivamente hasta aproximadamente los 30 días de cultivo, momento en el que comenzó a estabilizarse alrededor de los 20 nódulos por planta. A las tres semanas del comienzo del experimento, todas las plantas presentaron nódulos excepto aquellas que no habían sido inoculadas como control negativo.

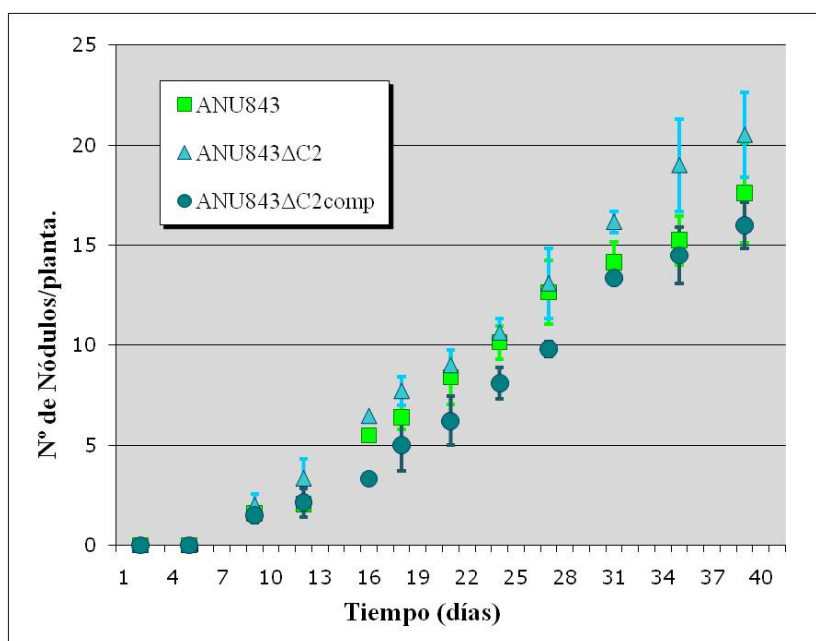


Figura 51. Cinética de nodulación de plantas de trébol blanco inoculadas con las cepas ANU843, ANU843 Δ C2 y ANU843 Δ C2comp. Las plantas se cultivaron en ausencia de nitrógeno durante 40 días. Los valores representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes, cada uno de los cuales se llevó a cabo con al menos 12 plantas.

El número medio de nódulos por planta a lo largo del experimento fue ligeramente inferior en la cepa silvestre que en el mutante ANU843 Δ C2 a los 40 días de inoculación, aunque las diferencias entre los valores medios no fueron estadísticamente significativas. El incremento en la nodulación en la cepa que tiene el gen *celC* interrumpido podría deberse a una menor capacidad infectiva ya que este es un rasgo típico de cepas inefectivas en la simbiosis *Rhizobium-leguminosa* (Fred *et al.*, 1932).

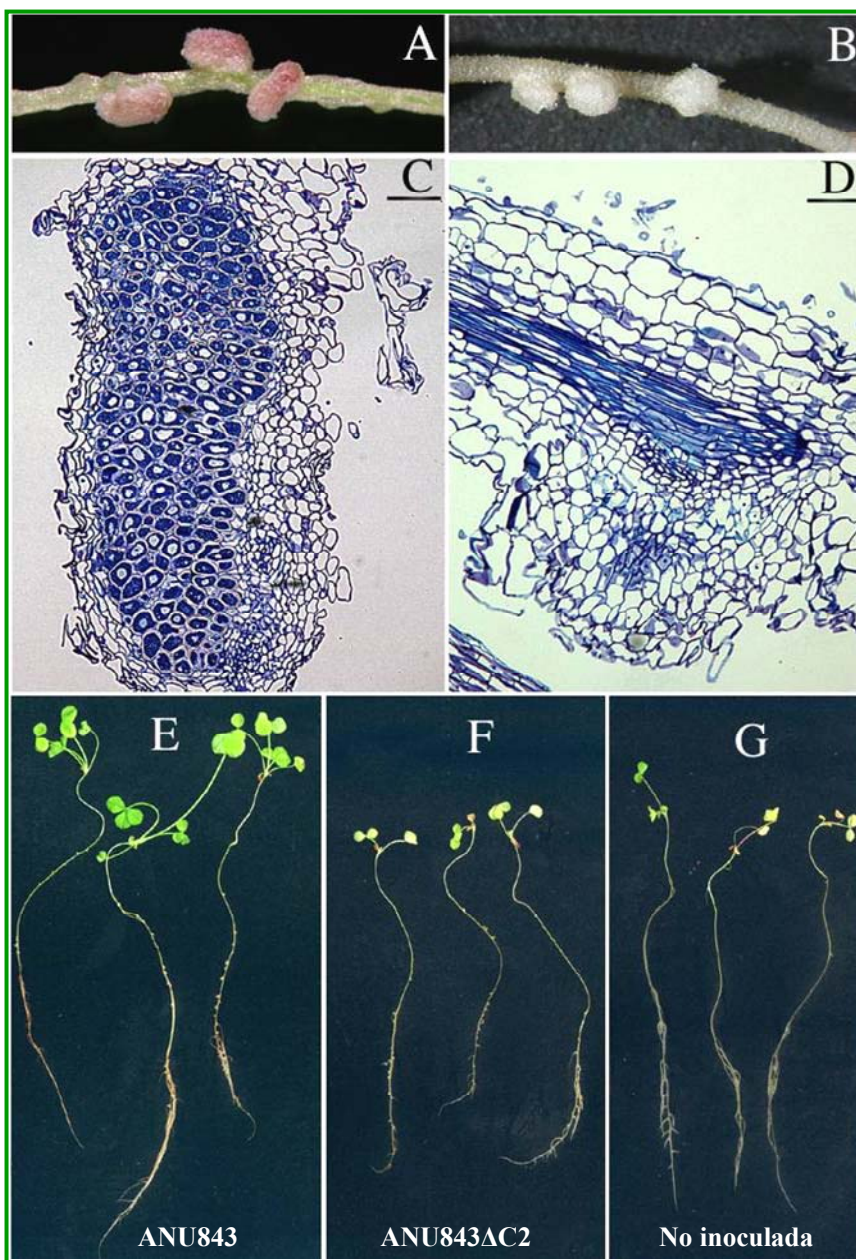


Figura 52. Desarrollo nodular (Nod) y fenotipo final (Fix) de plantas representativas de trébol blanco 40 días después de ser inoculadas con la cepa silvestre ANU843 (A, C, E), el mutante defectivo en el gen *celC* ANU843ΔC2 (B, D, F) y sin inocular (G). Se muestran por un lado zonas de la raíz que presentan nódulos (A, B), secciones longitudinales de estos (C, D) y la apariencia final de algunas plantas representativas (E, F, G). Escala 200 μ m.

El número de nódulos presentes en plantas de *Trifolium repens* inoculadas con las cepas de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843ΔC2comp tampoco difiere significativamente en ningún punto según el test LSD protegido de Fisher para $P = 0,05$, sin embargo, se observa una ligera tendencia a ser inferior al de la cepa ANU843. Como se ha visto a lo largo de este capítulo, esta cepa complementada no solo restauró la capacidad de producir la celulasa CelC2 sino que su actividad celulolítica se vio incrementada con respecto a la de la cepa silvestre. El efecto del aumento de la producción de esta endoglucanasa podría estar relacionado con esta

menor capacidad de inducir la producción de nódulos en trébol. Este fenotipo simbiótico se tratará ampliamente en los capítulos siguientes de esta memoria.

A los 40 días de comenzar el ensayo, los nódulos procedentes de las plantas de trébol crecidas en presencia de su hospedador habitual, la cepa ANU843, presentan una morfología piriforme y un color rojizo indicativos de que se está llevando a cabo una simbiosis efectiva fijadora de nitrógeno en su interior (Figura 52 A). Por el contrario, la mayoría de las plantas que fueron inoculadas con el mutante ANU843 Δ C2, que carece de la celulasa C2, presentaron un gran número de nódulos más pequeños, redondeados y blancos, que indicaban la ausencia de microorganismos en su interior y, por lo tanto, de actividad fijadora de nitrógeno (Figura 52 B).

Con el objetivo de estudiar histología de los nódulos y la presencia de bacteroides fijadores de nitrógeno en su interior, se seleccionaron algunos representativos de cada experimento que fueron separados de la raíz y sometidos a fijación, corte y tinción como se describe en el apartado 4.6.1 de la sección materiales y métodos. El análisis microscópico de los nódulos de las plantas inoculadas con la cepa ANU843 permitió observar como las bacterias habían invadido su interior formando simbiosomas fijadores de nitrógeno, tal y como ocurre en los nódulos indeterminados una vez han sido infectados (Figura 52 C). Sin embargo, en aquellos nódulos seleccionados de las plantas inoculadas con el mutante ANU843 Δ C2 no se pudieron observar estas estructuras, demostrando que los microorganismos no han conseguido invadirlos y se encuentran vacíos (Figura 52 D).

Para confirmar si existían bacterias en el interior de estos nódulos, se transformaron las cepas de estudios con el plásmido pHC60 que expresa de forma constitutiva la proteína fluorescente verde (GFP) de la medusa *Aequoria victoria* (Cheng y Walker, 1998). Una vez obtenidas las cepas ANU843GPF y ANU843 Δ C2GPF, se llevaron a cabo varios ensayos de nodulación con gran cantidad de plantas comprobando que la expresión de la GFP no afecta a los parámetros de nodulación de estas cepas (datos no mostrados). Una vez dados por finalizados los ensayos, mediante microscopía de fluorescencia se pudo confirmar nuevamente que la mayoría de las plantas inoculadas con la cepa ANU843 Δ C2GPF (Figura 53 E) presentan nódulos vacíos, a diferencia de lo que ocurre con la cepa silvestre (Figura 53 A).

Sin embargo, se había observado que en un pequeño porcentaje (alrededor del 10 %) de plantas de trébol inoculadas con la cepa ANU843 Δ C2, aunque existían un gran número de nódulos redondeados inefectivos, sorprendentemente aparecían uno o dos nódulos de color rosa. Además, la mayoría de plantas portadoras de estos nódulos mostraron un desarrollo normal y hojas de color verde, indicativos de que la fijación de nitrógeno podía estar llevándose a cabo en ellos. Para estudiar este proceso poco frecuente, se llevaron a cabo varios ensayos de nodulación con gran cantidad de plantas, seleccionando aquellas que desarrollaron nódulos aparentemente efectivos para ser sometidos posteriormente a microscopía confocal de fluorescencia y microscopía óptica de las secciones teñidas con azul de toluidina (Figuras 53 y 54).

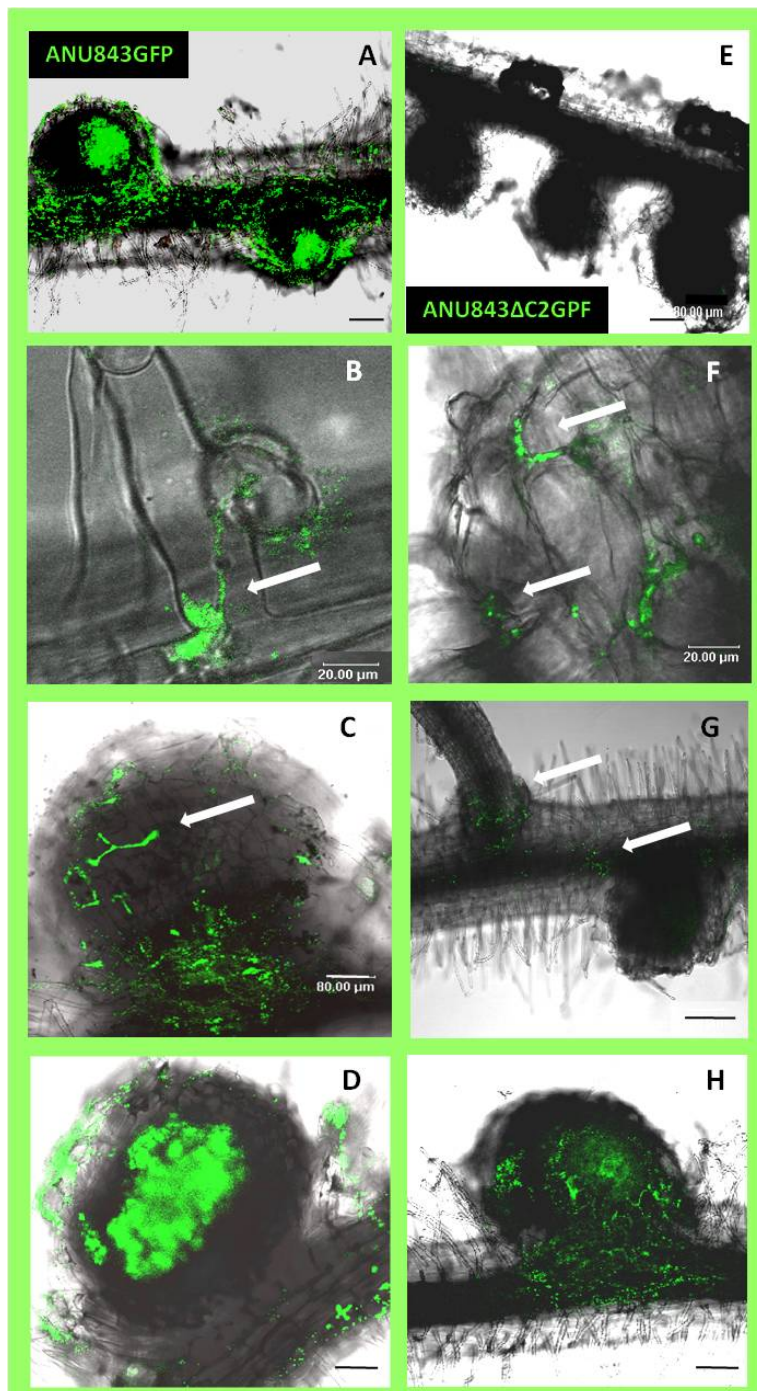


Figura 53. Microscopía de fluorescencia de distintas etapas del proceso de infección en *T. repens* por las cepas ANU843GPF (A-D) y ANU843ΔC2GPF (E-H). Las imágenes A y E muestran secciones de la raíz que representan el patrón general de ocupación nodular en ambas cepas a los 25 dpi. En B) se puede observar un pelo radical donde se está dando lugar a la formación de un canal de infección (flecha) por parte de la cepa ANU843GPF. La liberación desde estos canales en el nódulo se representa en la imagen C con una flecha y en D se muestra un nódulo maduro totalmente ocupado. Las imágenes F-H corresponden a zonas de la raíz de las plantas minoritarias inoculadas con ANU843ΔC2GPF en las que parecía haber nódulos de color rosa. En F se muestra un detalle de una zona cercana a una raíz emergente y las flechas señalan las zonas de entrada y ocupación de espacios intercelulares por parte de los microorganismos. En G se muestra una sección de la raíz y las flechas señalan zonas en las que las bacterias penetran tanto por las zonas de nacimiento de raíces laterales como en la intersección de nódulos. La imagen H muestra un nódulo parcialmente ocupado. Escalas 80 μm (A, B y E-H) y 20 μm (C, D).

En los ensayos llevados a cabo mediante microscopía de fluorescencia, tal y como se había observado anteriormente (Figura 50) no se detectaron canales de infección en los pelos radicales en las plantas inoculadas con ANU843 Δ C2GFP, pero sí de forma frecuente en la cepa ANU843wt (Figura 53 B). Sin embargo, si se pudo detectar la capacidad de invasión del interior de la planta de la cepa ANU843 Δ C2GFP a través de espacios intercelulares (Figura 53 F) o de canales iniciados por la entrada a través de grietas (“cracks”) en las zonas de emergencia de raíces secundarias o en la unión del nódulo a la raíz (Figura 53 G), generando en ocasiones nódulos que están parcialmente infectados (Figura 53 H) probablemente mediante estos mecanismos. Estos procesos difieren sustancialmente del proceso de infección canónico que tiene lugar tras la inoculación con la cepa ANU843GFP, donde los canales de infección suelen liberar las bacterias en la zona terminal del nódulo (Figura 53 C) donde, tras la división de las células ocupadas, finalmente es infectado casi en su totalidad (Figura 53 D).

Finalmente, los nódulos de color rosa que aparecían de forma poco frecuente en las plantas inoculadas con la cepa ANU843 Δ C2, fueron sometidos a cortes histológicos (Figura 54). Los resultados muestran que algunos se encuentran parcialmente infectados y que las células ocupadas no se distribuyen uniformemente como se puede apreciar en los cortes histológicos de nódulos ocupados por la cepa silvestre (Figura 52 C). Además, pudimos observar que parece que la invasión de los nódulos se llevó a cabo a través de espacios intercelulares epidérmicos iniciados por la entrada de la cepa ANU843 Δ C2 a través de grietas o “cracks” (Figura 54, flechas negras) seguidos por la acumulación de bacterias en los reservorios o “pockets” intercelulares (Figura 54, flechas blancas) pero tampoco se detectaron canales de infección trans-celulares.

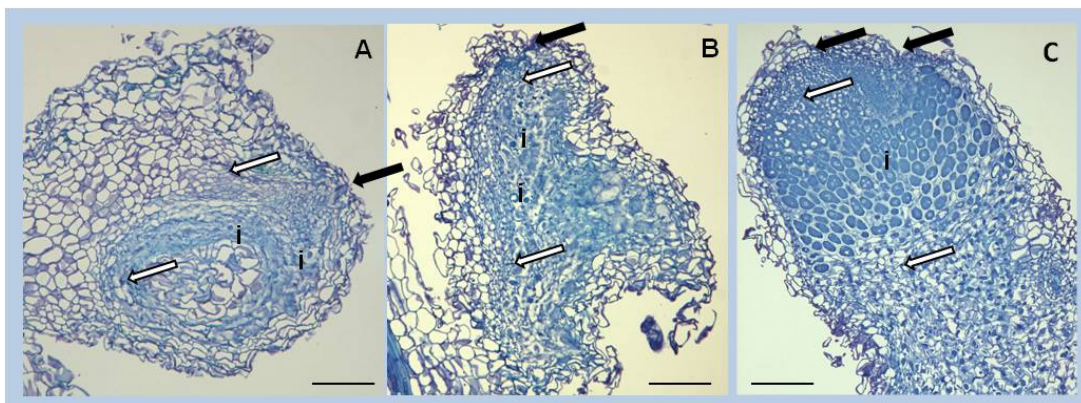


Figura 54. Secciones longitudinales de nódulos aparentemente ocupados que aparecieron en algunas plantas de trébol blanco 40 días después de ser inoculadas con la cepa ANU843 Δ C2. Las flechas negras corresponden con zonas de invasión a través de espacios intercelulares epidérmicos y las blancas indican acumulación de bacterias en los reservorios intercelulares. i: células aparentemente infectadas. Escala 500 μ m.

Estos datos concuerdan con los datos publicados recientemente por Madsen y colaboradores en 2010 en los que observan la infección de plantas de *Lotus japonicus* que nodulan espontáneamente debido a una mutación en la calmodulina receptora de los pulsos de calcio. Estos nódulos son invadidos por bacterias de la especie *M. loti* que penetran a través de esta ruta alternativa de entrada intercelular en ausencia del sistema de señalización de los factores de nodulación, incluso si la planta es inoculada con mutantes incapaces de sintetizar factores de nodulación funcionales; aunque la frecuencia de infección se reduce considerablemente (Madsen *et al.*, 2010).

Estos autores concluyen que estos modos de entrada, descritos más ampliamente en el apartado 4.2 de la introducción, son más arcaicos pero actualmente también los utilizan las bacterias cuando no puede establecerse el modo de entrada canónico a través del pelo radical, más complejo y regulado, pero más efectivo en la fijación de nitrógeno. Este “cambio” en el modo de entrada de las bacterias en el interior de los nódulos también había sido previamente descrito en *Azorhizobium caulinodans*, que es capaz de infectar la leguminosa acuática *Sesbania rostrata* por medio de estas fisuras intercelulares o “cracks” cuando la planta carece de pelos radicales en condiciones de encharcamiento (Capoen *et al.*, 2010; Goormachtig *et al.*, 2004).

Resumiendo este apartado, los ensayos de nodulación muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas en la cinética de nodulación ni en el número final de nódulos totales en las plantas inoculadas con las cepas ANU843, ANU843 Δ C2 y ANU843 Δ C2comp, pero sí en la morfología y ocupación de estos. Estas observaciones nos permiten confirmar que la mutación del gen *celC* bloquea el proceso de infección canónico de *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843 y afecta significativamente a su entrada en la planta, que se restringe a casos aislados a través de espacios intercelulares debido al aborto del proceso de infección a través de pelos radicales. Esta limitación se verá reflejada en la capacidad en el desarrollo de la planta en ausencia de nitrógeno, tal y como se describe a continuación.

3.2.2.2 Desarrollo de las plantas y fijación de nitrógeno (Fix)

Una vez dados por finalizados los ensayos monoxénicos de nodulación a los 40 días, se puede apreciar que las plantas de trébol crecidas en presencia de su hospedador habitual, la cepa ANU843 (Figura 52 E), se desarrollan y crecen con normalidad en un medio carente de nitrógeno ya que éste se lo proporciona el microsimbionte al penetrar en su interior y llegar hasta los nódulos. Por el contrario, la mayoría de las plantas que fueron inoculadas con el mutante ANU843 Δ C2 (Figura 52 F), que carece de la celulasa C2, presentaron un desarrollo inferior, similar al de los controles negativos sin inocular (Figura 52 G).

Para cuantificar estas diferencias, se tomaron medidas de la longitud de la parte aérea y de la raíz de las plantas representativas de tres experimentos independientes y se analizaron los datos obtenidos mediante el test de Fisher. Como era de esperar, se encontraron diferencias significativas entre la longitud de la parte aérea de las plantas inoculadas con la cepa silvestre ANU843 y el mutante

ANU843 Δ C2 (Figura 55 A), cuyo porte, a su vez, no mostró diferencias significativas con el control negativo sin inocular. Estos resultados confirman que la simbiosis entre la cepa ANU843 Δ C2 y *Trifolium repens* no es efectiva en la fijación de nitrógeno. La longitud de la raíz de las plantas inoculadas con las distintas cepas de estudio no difirió significativamente entre ellas (Figura 55 B).

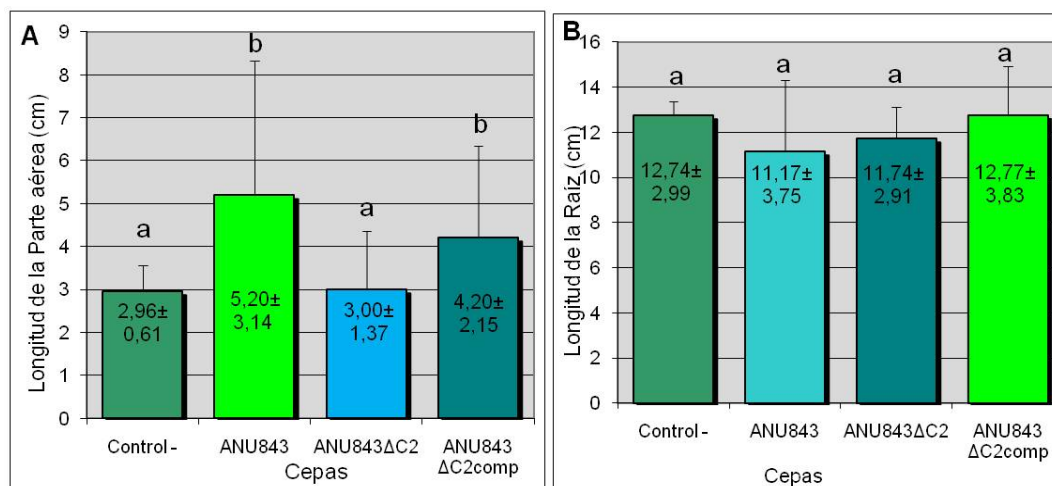


Figura 55. Longitud de la parte aérea (A) y de la raíz (B) de las plantas de trébol (*Trifolium repens*) sin inocular (Control-) e inoculadas con las cepas ANU843, ANU843 Δ C2 y ANU843 Δ C2comp. Las plantas se cultivaron en ausencia de nitrógeno durante 40 días. Los datos que se presentan son los valores medios representativos de tres experimentos independientes y su correspondiente desviación estándar. Cada uno de los experimentos se llevó a cabo con al menos 12 plantas. Para cada parámetro, los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente según el test LSD protegido de Fisher para $P = 0,05$.

Las plantas inoculadas con la cepa ANU843 Δ C2comp presentaron un fenotipo simbiótico similar al de la cepa silvestre ANU843 (Figura 56). Así, la mayoría desarrolló nódulos fijadores y no se observaron diferencias significativas en la longitud aérea de las plantas inoculadas con la cepa silvestre y la complementada (Figura 55 A). Sin embargo, sí hubo diferencias significativas entre la cepa ANU843 Δ C2 y ANU843 Δ C2comp, demostrando que la cepa complementada ha recuperado la capacidad de penetrar en las plantas de trébol y fijar nitrógeno en el interior de los nódulos.

La longitud aérea media de las plantas inoculadas con la cepa ANU843 Δ C2comp no llegó a alcanzar la observada en la cepa silvestre (Figura 55A), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Este hecho podría deberse a que, como ya se ha comentado, en la cepa complementada la expresión del gen *celC* es mayor ya que no está siendo regulada de la misma forma que en la cepa ANU843 porque no se encuentra en el cromosoma controlado por su propio promotor sino que se encuentra en un plásmido con un promotor distinto de expresión constitutiva. El efecto de la sobreexpresión del gen *celC* será ampliamente abordado en el próximo capítulo de esta memoria.

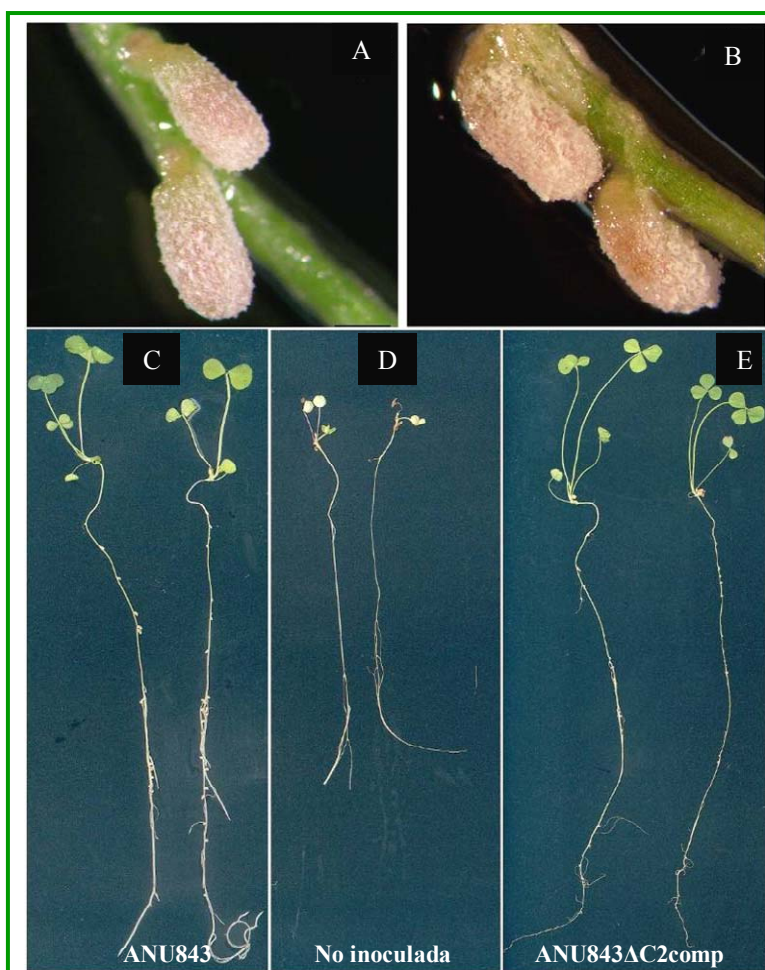


Figura 56. Desarrollo nodular (Nod) y fenotipo final (Fix) de plantas de trébol blanco 40 días después de ser inoculadas con la cepa silvestre ANU843 (A, C) y la cepa complementada en el gen *celC* ANU843ΔC2comp (B, E). Se muestran por un lado zonas de la raíz que presentan nódulos (A, B) y la apariencia final de algunas plantas representativas (C, E) en comparación de los controles negativos sin inocular (D).

El cultivo hidropónico de plantas en medio monoxénico se llevó a cabo en el interior de tubos de vidrio de 20 cm de alto, como se describe en el apartado de materiales y métodos. Esta técnica resulta muy válida para mantener controladas condiciones de cultivo y observar periódicamente la formación de nódulos en las plantas, pero resulta un poco limitante cuando se pretende comparar el potencial fijador de nitrógeno de distintas cepas, ya que en ocasiones la altura de los tubos limita el desarrollo de la planta. Por ello, para comprobar mejor las diferencias entre el desarrollo de las plantas sin nitrógeno y compararlo con el crecimiento de trébol en presencia de este elemento, se llevaron a cabo ensayos en invernadero con las cepas ANU843 y ANU843ΔC2 en dichas condiciones. Los datos obtenidos se muestran en la figura siguiente.

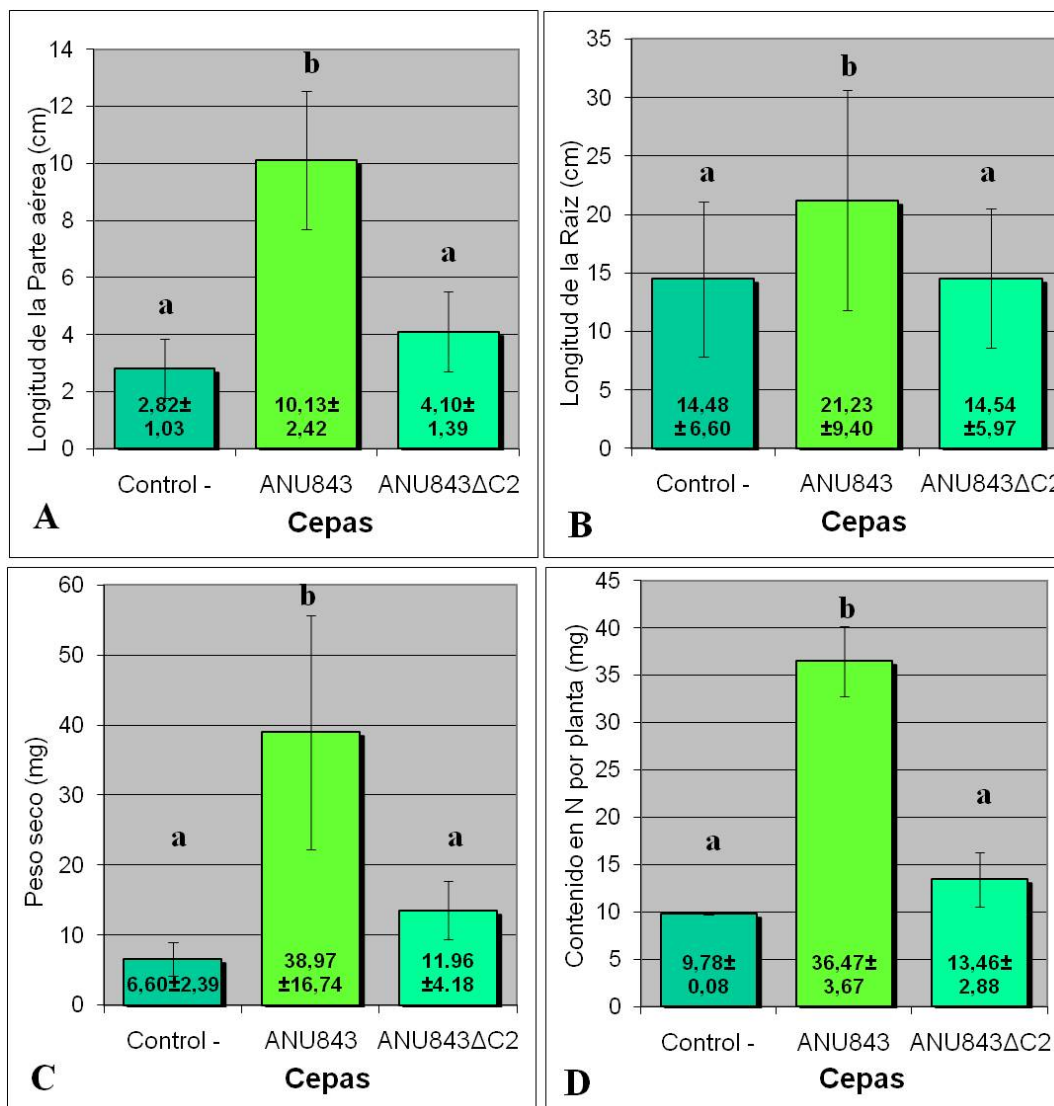


Figura 57. Eficiencia fijadora de las cepas de estudio determinada mediante la longitud de la parte aérea (A), de la raíz (B), peso seco (C) y contenido en nitrógeno medio (D) de las plantas de trébol (*Trifolium repens*) sin inocular (Control-) e inoculadas con las cepas ANU843 y ANU843ΔC2 en ensayos de invernadero. Las plantas se cultivaron en ausencia de nitrógeno durante 90 días. Los datos que se presentan son los valores medios representativos de dos experimentos independientes y su correspondiente desviación estándar. Cada uno de los experimentos se llevó a cabo con al menos 24 plantas. Para cada parámetro, los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente según el test LSD protegido de Fisher para P = 0,01.

Con el objetivo de analizar la eficiencia fijadora de las cepas de estudio se llevaron a cabo medidas de parte aérea y radicular, peso seco y contenido en nitrógeno de la parte aérea de plantas inoculadas con el mutante ANU843ΔC2 y la cepa silvestre, utilizando como control cepas sin inocular (Figura 57). En todas las determinaciones, los valores relativos a las plantas inoculadas con el mutante fueron significativamente inferiores con un nivel de confianza del 99%, superior al obtenido en los ensayos en cultivo hidropónico en tubo. De nuevo se observó que los datos obtenidos incluso son similares a los que se obtienen con las plantas

que no están inoculadas, signo claro de la ausencia de fijación de nitrógeno en las inoculadas con la cepa ANU843 Δ C2. Cabe destacar que el contenido en nitrógeno detectado en las plantas inoculadas con este mutante es muy similar al de las no inoculadas y cercano al límite de detección de esta técnica, por lo que se puede concluir que esta bacteria es prácticamente incapaz de llegar a los nódulos y formar simbiosomas efectivos en la fijación de N.

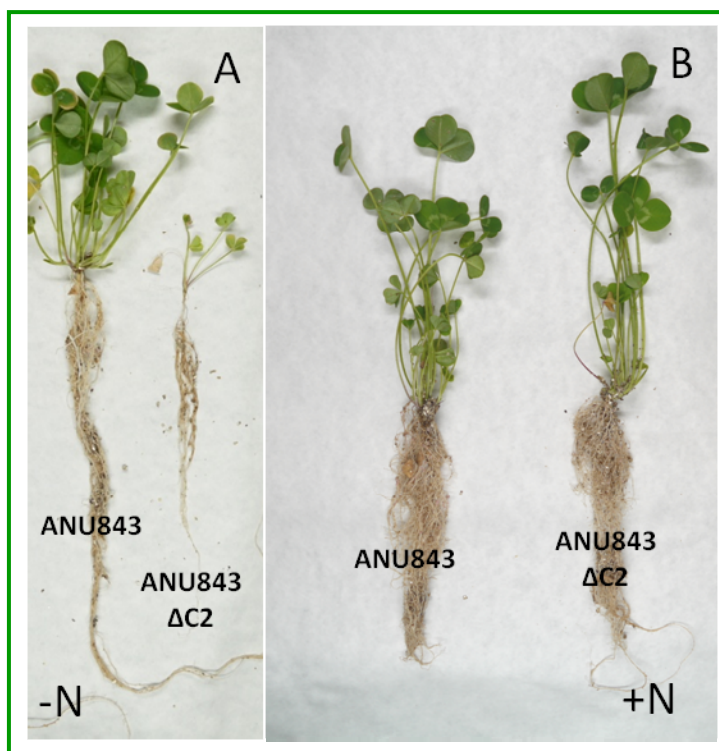


Figura 58. Fenotipo final (Fix) de plantas de trébol blanco 90 días después de ser inoculadas con la cepa silvestre ANU843 y la cepa con el gen *celC* interrumpido ANU843 Δ C2. Se muestra la apariencia final de plantas representativas en ausencia de nitrógeno (A) en comparación con el desarrollo normal en presencia de este elemento (B).

Como se puede observar, las plantas inoculadas con la cepa silvestre ANU843 (Figura 58 A) presentaban un desarrollo mayor y hojas más verdes que aquellas inoculadas con el mutante ANU843 Δ C2, que presentaron un aspecto amarillento y un desarrollo muy limitado en ausencia de nitrógeno. Este aspecto representa un síntoma claro de que la ausencia de nitrógeno en el medio y la incapacidad de fijarlo hace que vean mermado su desarrollo y se vuelvan cloróticas una vez que el nitrógeno que almacenaban en los cotiledones es consumido, ya que si se compara con el desarrollo de las plantas crecidas en las mismas condiciones pero en presencia de nitrógeno (Figura 58 B), se puede observar como efectivamente es únicamente la falta de este nutriente la que interrumpe su crecimiento. Estos datos se confirman además ya que en presencia de este elemento no se observaron diferencias significativas en el desarrollo de las plantas inoculadas con las cepas ANU843 y ANU843 Δ C2 (datos no mostrados).

Los ensayos realizados muestran que tanto la cepa silvestre ANU843 como el mutante ANU843 Δ C2 inducen la formación de nódulos en las raíces de trébol, pero sólo en los primeros se observó la capacidad de formar canales de infección en los pelos radicales que les conduzcan hasta los nódulos. Así, las plantas de trébol inoculadas con los mutantes que no producen la celulasa C2 muestran un gran número de nódulos inefectivos y un desarrollo aéreo similar al de los controles negativos sin inocular debido a la ausencia de nitrógeno en el medio y a la incapacidad del microorganismo de llegar hasta el nódulo para llevar a cabo su función, mientras que la cepa complementada con el gen *celC* restauró dicha capacidad, lo que confirma la funcionalidad del enzima CelC2 y su papel esencial en el proceso de infección primaria.

CAPÍTULO III:

Análisis funcional del gen celC mediante la obtención de mutantes superproductores



CAPÍTULO III: ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN celC (II): PROCESO DE INFECCIÓN SECUNDARIA

Nuestro siguiente objetivo era comprobar si existía alguna relación entre la celulasa CelC2 de *R. leguminosarum* bv. trifolii y la liberación de las bacterias y la formación de los simbiosomas, es decir, en el proceso de infección secundaria. Y como una primera aproximación para estudiar el posible efecto de este enzima en el proceso, se llevó a cabo la construcción de una cepa recombinante superproductora de la celulasa con el fin de analizar su fenotipo simbiótico y compararlo con el de la cepa silvestre de *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843.

1. OBTENCIÓN DE LA CEPA RECOMBINANTE *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ANU843C2⁺

Para llevar a cabo la obtención de la cepa superproductora de la celulasa CelC2 se transformó la cepa silvestre con un vector estable que expresa constitutivamente el gen *celC*, el plásmido pJZC2, (ver apartado 3 del capítulo II de los resultados). Así, la cepa *E. coli* DH5 α que contenía esta construcción se utilizó como cepa donadora en cruces triparentales con la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ANU843, para posteriormente seleccionar aquellos transformantes que eran resistentes a kanamicina. Paralelamente, la cepa silvestre también se transformó con el vector pBBRMCS-2 vacío y se seleccionó de la misma manera.

Ambos conjugantes se confirmaron mediante la extracción de ADN plasmídico y la digestión con los enzimas KpnI y XbaI para comprobar la presencia y ausencia de un fragmento del tamaño adecuado que contiene el gen *celC*. De esta manera se comprobó la presencia de un fragmento del tamaño esperado en el plásmido pJZC2, y esta cepa fue denominada ANU843C2⁺. Posteriormente, esta cepa fue sometida a distintos ensayos de actividad enzimática para comprobar si tenía una mayor capacidad de producción de actividad carboximetilcelulásica correspondiente a la celulasa *celC*. A la cepa transformante que contenía el vector vacío se le denominó ANU843EV (*empty vector*), y fue utilizada como control en alguno de los experimentos que se describen a continuación.

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS OBTENIDAS

2.1. Actividad celulolítica

Los ensayos enzimáticos utilizados para determinar cualitativa y cuantitativamente las diferencias en la actividad celulolítica de la cepa silvestre y la cepa recombinante obtenida fueron: actividad celulolítica en colonias, difusión radial en placa, electroforesis con posterior revelado de actividad (zimograma) y valoración de azúcares reductores. Ya que todos ellos están dotados de alta sensibilidad, se pudo confirmar un aumento de actividad carboximetilcelulásica en los extractos sonicados de la cepa ANU843C2⁺ con respecto a la cepa silvestre.

2.1.1. Ensayo en colonias y de difusión en placa

Como una primera aproximación, se llevó a cabo la determinación de la actividad celulolítica de las colonias de las cepas ANU843 y ANU843C2⁺, comparando el halo correspondiente a la degradación de la CMC presente en el medio tras el revelado. Pese a ser un ensayo sin valor cuantitativo, se pudo observar cómo los cultivos celulares de la cepa ANU843C2⁺, producen un halo de hidrólisis muy superior al de la cepa silvestre (Figura 59 A).

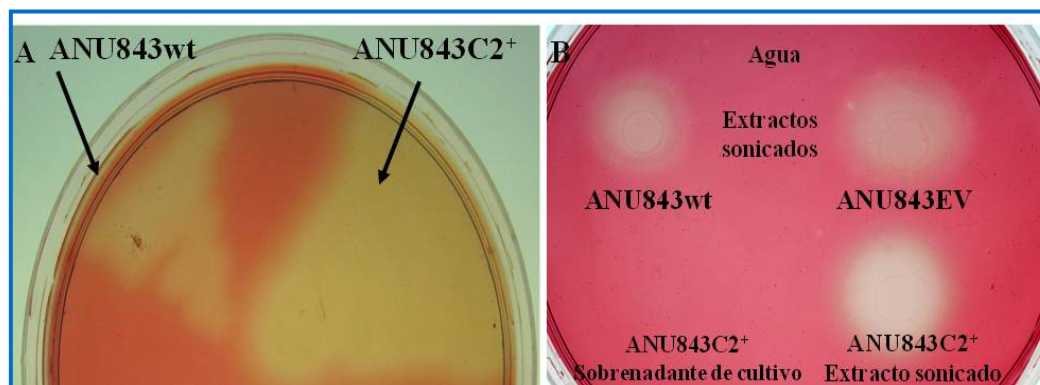


Figura 59. Ensayos de actividad carboximetilcelulásica de las cepa *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843, ANU843EV y ANU843C2⁺. A) Ensayo de crecimiento en estria en medio YMA con CMC. B) Ensayo difusión radial en placa de los sobrenadantes de cultivo y los extractos celulares obtenidos por sonicación. Como control negativo de la actividad celulolítica se utilizó agua destilada estéril.

El ensayo en placa de doble capa se llevó a cabo con sobrenadantes de cultivos celulares y extractos sonicados como fuente de distintas fracciones enzimáticas. Este ensayo nos permitió confirmar en primer lugar que la transformación de la cepa silvestre ANU843 con el plásmido pBBRMCS-2 vacío no produce ningún cambio sobre la capacidad de la cepa parental de producir celulasas ya que la actividad observada en los extractos sonicados de la cepa ANU843EV es similar a la observada en los de la cepa ANU843wt (Figura 59 B). Por otro lado, también se comprobó cómo la sobreexpresión del gen *celC* dio como resultado un aumento de la actividad celulasa como se deduce de la intensidad de los halos que resulta de la hidrólisis del sustrato (Figura 59 B).

A pesar de este exceso de producción, la mayor parte de la actividad carboximetilcelulásica detectada en ANU843C2⁺ permanece asociada a la pared celular de las bacterias, ya que los resultados fueron siempre negativos cuando se utilizaron como soluciones enzimáticas las fracciones extracelulares (sobrenadantes de cultivo) de las mismas. Por tanto, el procesamiento y localización de los enzimas hidrolíticos en las cepas recombinantes obtenidas no se ha visto alterado, permaneciendo unidos a la célula.

Si bien estos ensayos no tienen valor cuantitativo, sí permiten observar diferencias entre los halos de hidrólisis de mayor diámetro en la cepa ANU843C2⁺, que en la cepa silvestre. Estas diferencias podrán ser comprobadas de manera más fiable con el ensayo cuantitativo (BCA) utilizando las mismas cepas, pero antes se comprobó si esa mayor producción de celulasa se debe efectivamente a la sobreexpresión de la proteína C2 mediante un zimograma.

2.1.2. Electroforesis en gels de poliacrilamida y zimograma

Como ya se ha comentado anteriormente, esta técnica permite la detección de isoenzimas con actividad celulolítica en extractos celulares sonificados tras su separación mediante electroforesis en condiciones semidesnaturalizantes (SDS-PAGE). En el caso de las proteínas contenidas en la fracción celular de la cepa ANU843C2⁺, en el gel de poliacrilamida ya pudo observarse la acumulación de una proteína de un tamaño que coincidía con el esperado para la celulasa C2 (31 KDa), que no se observaba en el carril correspondiente al extracto proteico de la cepa silvestre (Figura 60 A, flecha).

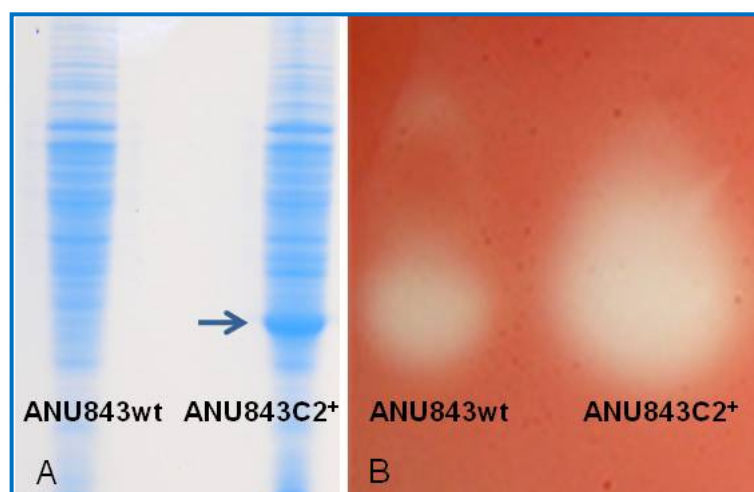


Figura 60. Electroforesis en gel de poliacrilamida (A) y zimograma de revelado sobre este gel para la detección de isoenzimas con actividad celulásica (B) en extractos celulares de las cepas de estudio. La flecha señala la acumulación de la proteína CelC2.

Tras ser sometido a incubación con un gel de agarosa que contenía CMC y, posteriormente, teñido con Rojo Congo para detectar la actividad celulolítica, se pudo ver claramente que la banda inferior, correspondiente a la proteína CelC2,

mostraba inequívocamente un aumento de la actividad en carboximetilcelulasa en el carril de la cepa ANU843C2⁺ que se debe a la sobreproducción del enzima CelC2, por lo que se deduce que efectivamente la construcción de la cepa ANU843C2⁺ ha sido satisfactoria (Figura 60 B).

2.1.3. Cuantificación de actividad celulolítica

Por último, se llevaron a cabo ensayos de detección de actividad celulolítica de forma cualitativa mediante la valoración de grupos reductores formados tras la hidrólisis de carboximetilcelulosa utilizando las mismas soluciones enzimáticas obtenidas por sonicación. Los valores recogidos (Figura 61) son la media de tres determinaciones en muestras obtenidas a partir de cultivos celulares sonicados y se representan en unidades enzimáticas (U).

Los resultados del ensayo de cuantificación de actividad carboximetilcelulásica revelan que los organismos superproductores de la celulasa CelC2 incrementan dicha actividad aproximadamente tres veces en comparación a la cepa silvestre. Por tanto, estamos en condiciones de afirmar que el mayor rendimiento conseguido es debido a la presencia de una copia activa del gen *celC* y por ello de actividad correspondiente al enzima CelC2. Además, estos resultados corroboran los obtenidos anteriormente utilizando otros métodos de detección de actividad, en los que esta cepa presentó un halo de hidrólisis enzimática más intenso.

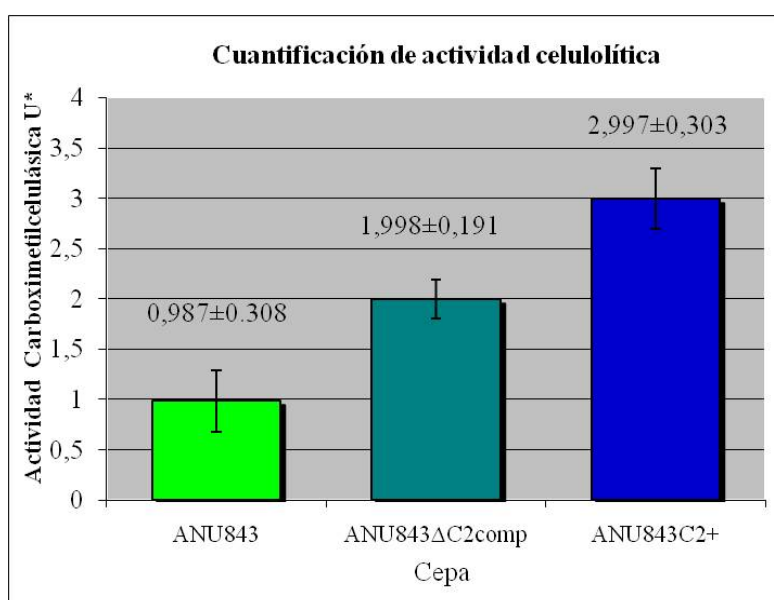


Figura 61. Actividad celulolítica en extractos celulares de la cepa silvestre *R. leguminosarum* by. *trifolii* ANU843, ANU843C2⁺ y ANU843ΔC2comp. Los datos corresponden a la media de al menos tres determinaciones independientes en las que en cada una se hicieron al menos tres medidas para cada tiempo y las barras de error representan la desviación estándar entre ellas. * Una unidad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que libera 1 nmol del azúcar reductor equivalente (glucosa) por min a 40 °C y pH 5,0.

Por otro lado, estos resultados nos permiten comprobar que, la restauración de la capacidad de producción de la celulasa CelC2 en la cepa complementada (ANU843ΔC2comp) mediante la transformación del mutante knock-out con un plásmido que contiene una copia del gen *celC* da lugar a una actividad intermedia entre la cepa silvestre y el superproductor. Por tanto, se puede asegurar que la integración del plásmido pJZC2 produce un incremento de actividad de 2U y que la actividad correspondiente al gen silvestre es de aproximadamente 1U.

2.2. Fenotipo simbiótico en *Trifolium repens*

Para comprobar el efecto del aumento de actividad de la celulasa CelC2 en el proceso de infección de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii en trébol, se comparó el fenotipo simbiótico de la cepa silvestre ANU843 y de la cepa recombinante ANU843C2⁺ mediante ensayos de infectividad y nodulación en cultivos monoxénicos y ensayos de producción vegetal en invernadero.

2.2.1. Ensayos de infectividad

Estos ensayos se llevaron a cabo inoculando plantas de trébol blanco (*Trifolium repens*) en placa con las cepas ANU843 y ANU843C2⁺, tal y como se describe en el apartado 4.5.2 de materiales y métodos. Las distintas etapas iniciales del proceso de infección fueron monitorizadas en las raíces de trébol a los pocos días de ser inoculadas mediante microscopía de contraste de fases y microscopía electrónica de barrido. También se tomaron imágenes utilizando bacterias marcadas con la proteína fluorescente verde (GFP) mediante microscopía confocal y de secciones nodulares mediante microscopía electrónica de transmisión.

2.2.1.1 Proceso de Infección Primaria: Penetración y formación del canal de infección (Hot/Inf)

Los pelos radicales de *Trifolium repens* inoculados tanto con la cepa silvestre ANU843 como con la cepa ANU843C2⁺, sufrieron las deformaciones típicas que presentan habitualmente en presencia de los factores de nodulación producidos por un rizobio compatible (fenotipo *Had*), pero en el caso de la inoculación con el microorganismo superproductor de la celulasa CelC2 parecían menos habituales. Estos resultados implican que la cepa ANU843C2⁺ puede producir alguna alteración en la percepción de los factores de nodulación compatibles con su planta hospedadora. A su vez, ambas cepas fueron capaces de inducir la formación de primordios nodulares en las raíces de la planta (fenotipo *Noi*).

Tanto en las plantas inoculadas con la cepa silvestre ANU843 como con la cepa recombinante ANU843C2⁺ se pudo apreciar la adhesión de las bacterias a la

superficie de la raíz (fenotipo Roa). Sin embargo, en la cepa superproductora de la celulasa CelC2, no se observó la formación de agregados tridimensionales en la punta de los pelos radicales, sino solamente de bacterias individuales. Este resultado pone de manifiesto que la adhesión de la cepa que sobreexpresa el gen *celC* puede verse afectada debido a que este gen se encuentra formando parte del operón *celABC* involucrado en la biosíntesis de celulosa (Ausmees *et al.*, 1999; Matthyse *et al.*, 1995), uno de los compuestos implicados a su vez en la adhesión de las bacterias a la planta, junto con ricadhesinas y lectinas. Esta posibilidad se analizará en profundidad en el capítulo V de esta memoria.

Por otro lado, mediante microscopía óptica y electrónica de barrido se pudo observar como la cepa silvestre era capaz de inducir en los pelos radicales la deformación típica que conduce al desarrollo del cayado de pastor o “curling” completo (fenotipo Hac) (Figura 62 B y C). Sin embargo, en las plantas inoculadas con la cepa superproductora ANU843C2⁺ se contabilizaron distintos tipos de deformaciones de los pelos radicales: algunos presentaban un curling similar al que se produce tras la inoculación con un rizobio compatible, sin embargo, un mayor número de pelos radicales presentaban una degradación exagerada del extremo terminal sin que se haya producido el “curling” completo (Figura 62 E, F) (Tabla 25). Estos resultados concuerdan con los obtenidos tras purificar la celulasa CelC2 y comprobar su efecto sobre las raíces de trébol, en los que se observó la hidrólisis localizada de la punta del pelo radical (Mateos *et al.*, 2001) (Figura 15).

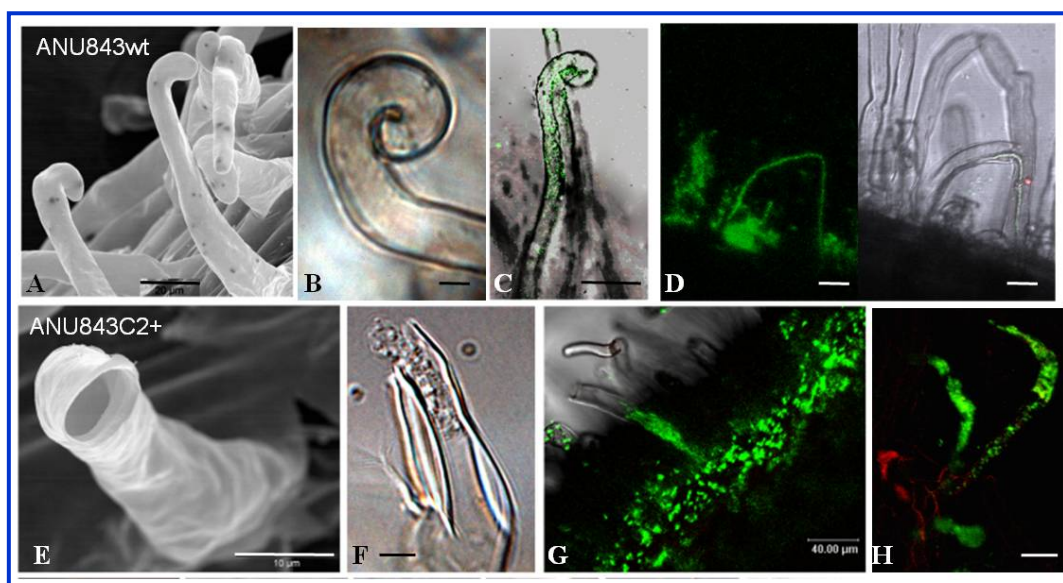


Figura 62. Sucesión de eventos relacionados con la infección primaria de plantas de trébol blanco inoculadas con las cepas ANU843 (A-D) y ANU843C2⁺ (E-H). Las imágenes fueron tomadas mediante microscopía electrónica de barrido (A, E), de contraste de fases (B, F) y confocal (C, D, G, H). En ellas se muestran los eventos de infección primaria canónicos que se suceden en *Trifolium repens* una vez inoculado con una cepa silvestre de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*: formación del “curling” y cayado de pastor (A, B, C) y del canal de infección (C, D). En la microfotografía E, se puede observar cómo la cepa superproductora del enzima CelC2 induce además la formación de un orificio de gran tamaño en la punta del pelo radical. Esto provoca, como muestra la imagen F, la extrusión del citoplasma de la célula y la entrada de las bacterias en el interior de los pelos radicales sin formar canales de infección (G, H). Escalas 20 μm (A-D), 10 μm (E, F) y 40 μm (G, H).

Una imagen más general de una zona de la raíz inoculada con la cepa ANU843C2⁺ permite observar que solo una fracción de pelos radicales se encuentran hidrolizados mientras que algunos permanecen intactos (Figura 63 A, tabla 25). Este efecto es diferente cuando se estudia la actividad biológica de la celulasa CelC2 purificada en la raíz de trébol después de 12 h de incubación enzimática (Figura 63 B), donde una mayor proporción de pelos han sido hidrolizados. Este hecho puede explicarse ya que en el caso de la preparación con el enzima purificado, éste se encuentra distribuido uniformemente en la solución en la que está inmersa la planta mientras que la cepa superproductora del enzima CelC2 solo actúa sobre aquellos pelos radicales en los que previamente se ha producido la adhesión ya que como se ha descrito anteriormente, el enzima no es excretado al sobrenadante de cultivo (Figura 59 B).

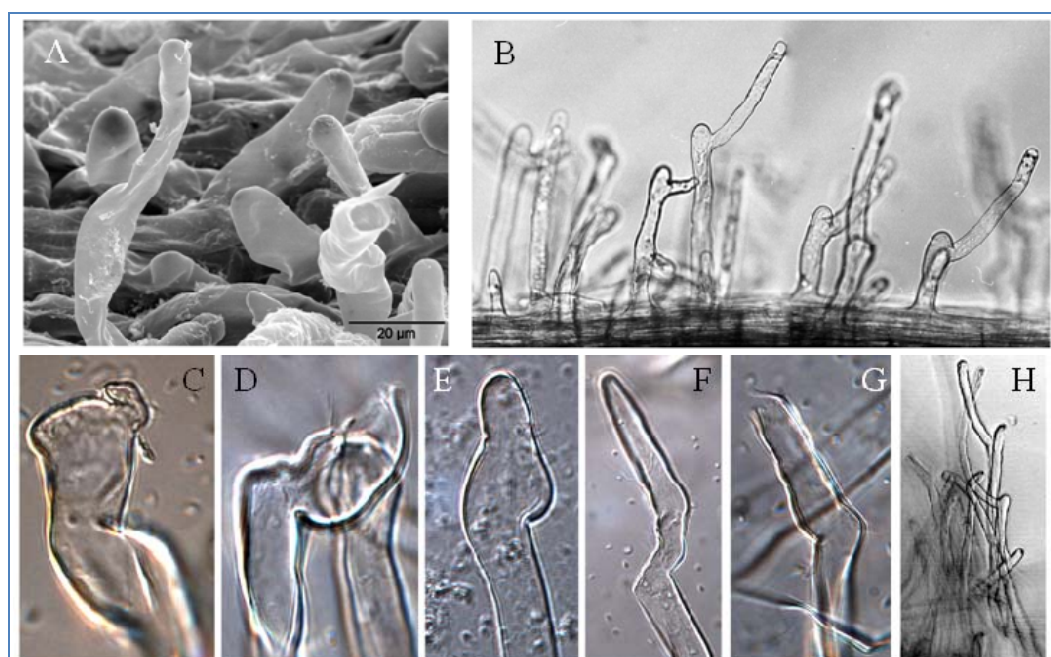


Figura 63. Microscopía electrónica (A) y óptica (B-H) de distintos eventos relacionados con la infección primaria en trébol blanco inoculado con la cepa superproductoras ANU843C2⁺ (A y C-H) y el enzima CelC2 purificado (B). Las imágenes (C-H) muestran algunos pelos que se regeneran tras la degradación de la punta del pelo radical manteniendo su viabilidad pero pudiendo ser hidrolizados de nuevo.

Por otro lado, utilizando bacterias marcadas con la proteína fluorescente verde (GFP) mediante microscopía confocal, pudo apreciarse la formación del canal de infección (fenotipo Inf) que progresa a lo largo del pelo radical hacia el córtex de la raíz en algunos pelos radicales de las raíces inoculadas con la cepa silvestre (Figura 62 C, D), signo claro de la capacidad de este microorganismo de atravesar la pared celular vegetal de la punta del pelo radical en algunos pelos (fenotipo Hot) una vez atrapado en la estructura de cayado de pastor. Sin embargo, los pelos radicales no viables tras la degradación del extremo terminal pueden ser invadidos intracelularmente de forma masiva por la cepa ANU843C2⁺, pero sin formar canales de infección como se observa en la cepa silvestre (Figura 62 G, H).

La degradación exagerada de la punta de los pelos radicales tanto por parte de la cepa superproductora de la celulasa CelC2 como del propio enzima CelC2 produce un orificio en la pared del pelo (Figura 63 A, B) que, en algunas ocasiones, se rodea por nuevo material de la pared celular impidiendo que la célula muera (Figura 63 C). Este hecho provoca generalmente una reorientación del pelo radical (Figura 63 D) que finalmente continua su crecimiento de forma polar (Figura 63 E, F). En ocasiones, estos pelos regenerados pueden llegar a ser hidrolizados nuevamente en el extremo que se encuentra en crecimiento (Figura 63 G). Esta sucesión de eventos de degradación-regeneración genera la aparición de pelos radicales con sucesivas redirecciones (Figura 63 H).

Las redirecciones de los pelos radicales también se observan tras el tratamiento con el enzima purificado (Figura 63 B), pero no suelen resultar en varias ramificaciones, probablemente debido a que la acción del enzima en estas condiciones se vea disminuida con el tiempo por efecto de la degradación provocada probablemente por proteasas producidas por la planta, mientras que en el caso de la cepa ANU843C2⁺, el organismo se encuentra continuamente produciendo el enzima.

Un estudio cuantitativo y detallado de estas raíces nos permitió hacer una estimación media del número de pelos radicales por centímetro de raíz en los que aparecían estos fenómenos de “curling” (Hac), degradación de la punta de los pelos radicales (Hot) y formación del canal de infección (Inf) en las cepas de estudio (Tabla 25). Así, se observa como la cepa recombinante ANU843C2⁺ produce un menor número tanto de deformaciones tipo cayado de pastor de los pelos radicales como de canales de infección que la cepa silvestre.

Tabla 25. Fenotipo simbiótico en las primeras etapas del proceso de infección de las cepas ANU843EV y ANU843C2⁺ inoculadas en trébol blanco. Los valores recogidos para cada uno de los fenotipos (Hac: hair curling, formación del cayado de pastor; Hot: orificio en la punta del pelo radical o redirección claramente producida tras la hidrólisis; Inf: infection thread, formación del canal de infección) muestran la media de al menos 10 plantas de cada experimento. Junto a cada valor aparece el error estándar de la media.

| FENOTIPO | CEPA INOCULADA | | |
|---------------|----------------|-----------------------|--------------|
| | ANU843EV | ANU843C2 ⁺ | NO INOCULADA |
| Hac/cm planta | 3,15 ± 0,69 | 2,18 ± 0,29 | 0 ± 0 |
| Hot/cm planta | 0,18 ± 0,08 | 3,82 ± 0,66 | 0,12 ± 0,09 |
| Inf/cm planta | 1,11 ± 0,54 | 0,15 ± 0,04 | 0 ± 0 |

Sin embargo, existen un gran número de pelos en los que se ha producido la hidrólisis del extremo terminal y por los que los microorganismos han podido invadir la planta (Figura 62 G, H). Este efecto, aunque en la mayoría de los casos es debido a la capacidad de la celulasa CelC2 de hidrolizar la punta del pelo radical, en un pequeño porcentaje puede ser debido a la pérdida de turgencia

durante el proceso de montaje de las plantas para tratamiento y visualización ya que se observa algún fenómeno tipo “Hot” aislado tanto en las plantas inoculadas con la cepa ANU843EV como sin inocular. No obstante, podemos afirmar que este efecto no es debido en ningún caso a la acción de la cepa silvestre ya que los resultados en ambos tratamientos son similares.

.2.2.1.2 Proceso de Infección Secundaria: liberación de las bacterias (Bar) y formación de los simbiosomas

Con el objeto de estudiar el proceso de infección secundaria en las plantas inoculadas con la cepa superproductora de la celulasa CelC2, se procedió a la visualización del interior de los nódulos inducidos por las cepas ANU843 y la ANU843C2⁺ mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 64).

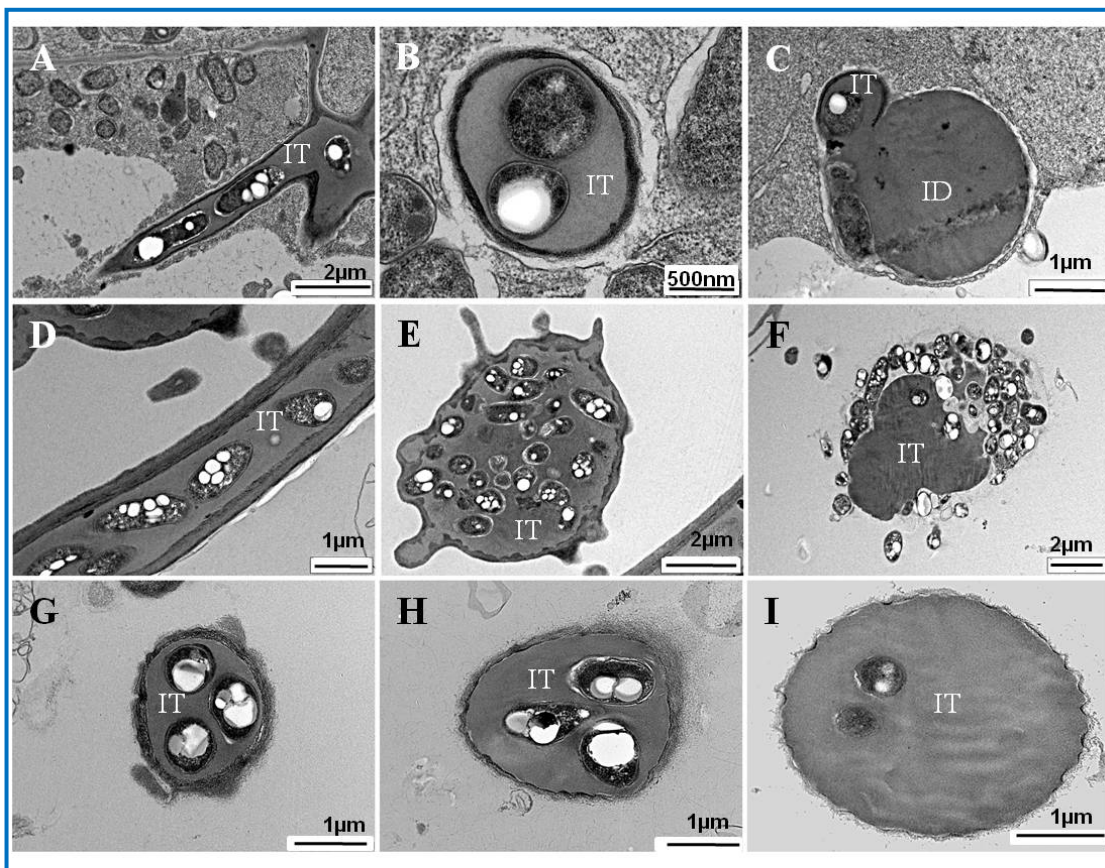


Figura 64. Liberación de las bacterias en el nódulo durante el proceso de infección secundaria. Las imágenes, obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión muestran el interior de nódulos de trébol inducidos por las cepas ANU843 (A-C) y ANU843C2⁺ (D-I). IT: infection thread (canal de infección), ID: infection droplet (zonas de infección secundaria). A) y D) son secciones longitudinales y B) y F) trasversales de ITs que contienen células vegetativas y el material que las rodea. La microfotografía C) muestra la hidrólisis localizada de la pared celular del IT para formar el ID durante la infección llevada a cabo por la cepa silvestre y las microfotografías F-I muestran en conjunto de eventos aberrantes y destructivos que tienen lugar durante la infección de la cepa que sobreexpresa la celulasa CelC2 una vez que alcanza las células del nódulo. Cabe destacar el notable ensanchamiento que se produce en los ITs que han sido degradados masivamente que se observa en las imágenes E) y F).

Como hemos visto anteriormente, la cepa silvestre ANU843 sigue los pasos previamente descritos tras la penetración de la bacteria en la raíz a través de la ruptura localizada de la pared celular en la punta del pelo radical. En el punto de infección se genera la formación del canal de infección que se dirige, atravesando las células del córtex, hacia el primordio nodular (Figura 64 A). Una vez en el interior del nódulo, las bacterias se degradan de forma puntual la pared celular del extremo terminal del canal de infección (Figura 64 B) lo que genera que la liberación al citoplasma de las células del nódulo del material existente en la luz del canal de infección, incluyendo las bacterias, pero siempre rodeadas de la membrana citoplasmática formando una estructura denominada "infection droplet" (Figura 64 C, ID).

En el caso de la cepa ANU843C²⁺, superproductora de la actividad celulásica correspondiente al enzima CelC2, las bacterias se dirigen a través del canal de infección a las células del nódulo tal como ocurre con la cepa silvestre (Figura 64 D, IT). Una vez en el interior del nódulo, en algunos casos se produce la degradación masiva de la pared celular del canal de infección en su extremo terminal por parte de los microorganismos (Figura 64 E-I), lo que origina su completa desorganización. Como consecuencia de la pérdida de rigidez, los canales de infección se ensanchan aumentando su diámetro (Figura 64 E-I) hasta que literalmente explotan liberando las bacterias al citoplasma sin rodearse de la membrana citoplasmática (Figura 64 F y figura 65 C, D).

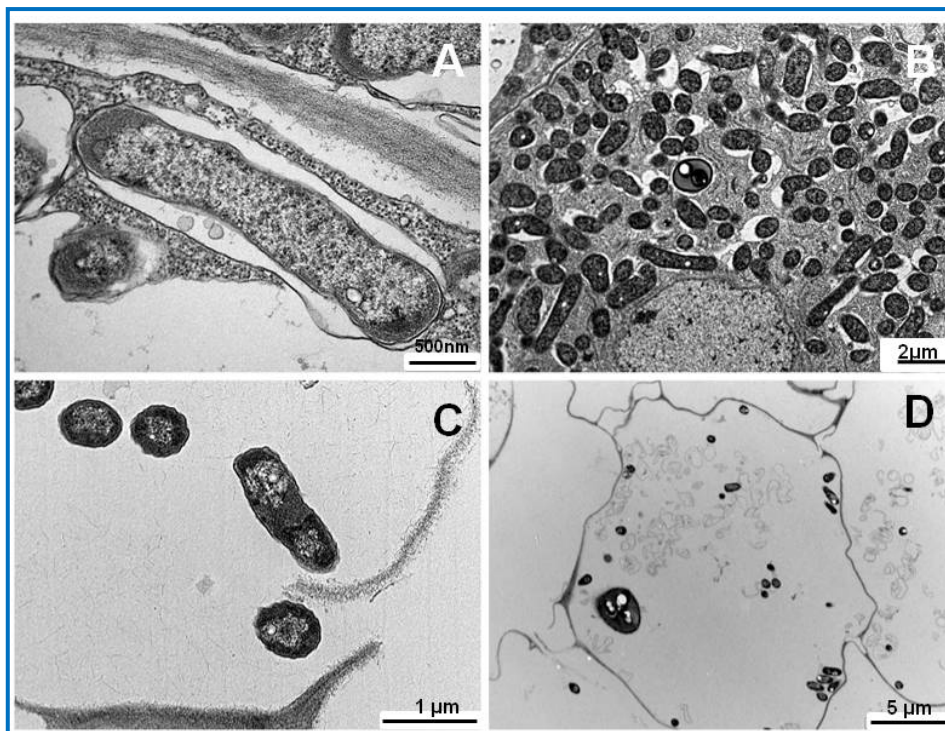


Figura 65. Formación de simbiosomas en el nódulo durante el proceso de infección secundaria. Las imágenes, obtenidas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión muestran el interior de nódulos de trébol inducidos por las cepas ANU843 (A, B) y ANU843C²⁺ (C, D). Las bacterias que se observan en las imágenes C y D se encuentran “desnudas” ya que han sido liberadas en las células del nódulo sin estar rodeadas por la membrana peribacterioidea.

La liberación de las bacterias sin rodearse de la membrana citoplasmática vegetal provoca a su vez que, en la mayoría de los casos, las bacterias de la cepa ANU843C2⁺ no se diferencien en la forma endosimbionte fijadora de nitrógeno (bacteroide) ni formen las estructuras típicas denominadas simbiosomas constituidas por el bacteroide rodeado por la membrana peribacteroidea de origen vegetal (Figura 65 C). Como consecuencia de la ausencia de esta membrana, las bacterias están en contacto directo con las células vegetales del nódulo lo que ocasiona su desorganización (Figura 65 D). Este comportamiento difiere significativamente del observado en la cepa silvestre, en la cual una vez en el citoplasma las bacterias se diferencian en bacteroides y forman los simbiosomas (Figura 65 A) en los que, gracias a la presencia de la membrana peribacteroidea, las bacterias no se encuentran en contacto directo con las células del nódulo (Figura 65 B).

Estos datos parecen indicar que la celulasa CelC2 interviene de una forma decisiva en la liberación de las bacterias del canal de infección siendo crítica su concentración, pues un exceso en la producción por parte de la cepa ANU843 conduce a una liberación de las bacterias sin membrana peribacteroidea alrededor. Como veremos a continuación, estas bacterias “desnudas” inducen un envejecimiento prematuro de los nódulos y las plantas inoculadas con ellas presentan una menor efectividad en la fijación de nitrógeno.

Como se ha expuesto anteriormente, la actividad de la enzima CelC2 se limita a la hidrólisis de la celulosa de composición no cristalina. Además, en estudios *in vitro* utilizando el enzima purificado, se ha comprobado previamente que existe una zona localizada en el ápice isotrópico no cristalino de los pelos radicales susceptible de ser hidrolizada por este enzima (Mateos *et al.*, 2001), creando el portal principal de entrada de los microsimbiontes en la planta. Sin embargo, hasta la fecha no se conoce si dentro de los nódulos que se forman en la planta también existen zonas potencialmente susceptibles a la hidrólisis de la celulasa CelC2, es decir, con una estructura no cristalina. Por ello, nos propusimos analizar más en detalle la arquitectura de la celulosa que forma la pared celular del exterior e interior de los nódulos, tras la inoculación con la cepa silvestre ANU843 (Figura 66).

Gracias a la utilización de microscopía de luz polarizada de las raíces de trébol blanco, pudimos observar cómo tanto las células epidérmicas y vasculares así como las que rodean las estructuras nodulares poseen una distribución uniforme de los polímeros de celulosa cristalina refráctiles de las paredes celulares (Figura 66 A). La única excepción, se produce en los sitios de infección primaria, es decir, las puntas de los pelos radicales en crecimiento (Figura 66 A, zona superior derecha ampliada).

Del mismo modo, los polímeros de la pared celular que son sintetizados a la vez que se forman los canales de infección conservan la arquitectura cristalina que se observa también en las paredes de la célula de los pelo radicales (Figura 66 B-C, flechas rojas). Sin embargo, en los puntos previstos para la liberación de bacterias en las células vegetales de los primordios nodulares o gotas de infección, la celulosa no comparte esta estructura isotrópica no cristalina y refráctil bajo luz polarizada (Figura 66, círculos rojos).

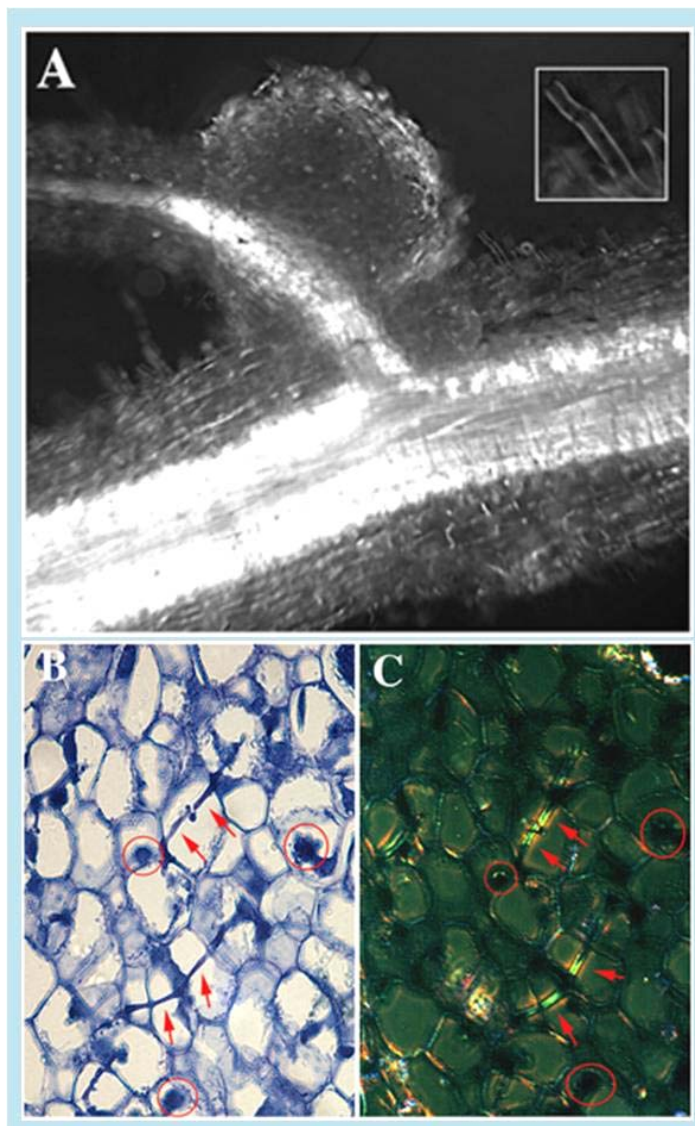


Figura 66. Visualización de la estructura de la celulosa en la epidermis y en las paredes de células vasculares de la raíz mediante microscopía de luz polarizada de raíces y nódulos de *Trifolium repens* (las zonas blancas o verde brillante son aquellas que refractan la luz y por tanto denotan que la pared celular de esa zona está compuesta por celulosa cristalina). A) La zona ampliada muestra un pelo radical en crecimiento con una estructura claramente no cristalina en la punta, mientras que el resto de estructuras de la raíz son refráctiles. (B y C) Corte histológico de la zona de infección de nódulos visualizados por microscopía de campo claro y de fluorescencia respectivamente. En ellos se puede observar que la pared celular de los canales de infección también es cristalina (flechas rojas), excepto en el lugar donde las bacterias se liberan (círculos rojos).

Estos datos concuerdan con la participación de la celulasa CelC2 en estas dos etapas claves que tienen lugar durante el establecimiento de una simbiosis fijadora de nitrógeno: el proceso de infección primaria y secundaria. Es decir, apoyan su intervención tanto en la entrada de las bacterias en el interior de la planta como en la liberación en los canales de infección, ya que en los lugares precisos donde tienen lugar estos procesos la composición de la pared celular vegetal concuerda con el sustrato específico de la celulasa CelC2 (celulosa no cristalina), restringiendo significativamente *in vivo* el lugar donde se lleva a cabo

su acción erosiva a aquellas zonas específicas de la raíz que carecen de una arquitectura cristalina de la pared.

2.2.2. Ensayos de nodulación

A continuación, se llevaron a cabo ensayos de nodulación inoculando plantas de trébol blanco (*Trifolium repens*) con las cepas ANU843 y ANU843C2⁺ tanto bajo condiciones monoxénicas en tubo a distintas concentraciones de inóculo en ausencia de nitrógeno, como en cultivo en invernadero en presencia y ausencia de este elemento. Estos experimentos nos permitieron analizar algunos parámetros de la simbiosis como la cinética de nodulación y comprobar macroscópicamente y microscópicamente la morfología de los nódulos así como el desarrollo de las plantas al ser inoculadas con la cepa superproductora de la celulasa CelC2.

.2.2.2.1 Morfología nodular y cinética de nodulación (Nod)

Tanto la cepa silvestre ANU843 como la cepa recombinante ANU843C2⁺ indujeron la formación de primordios nodulares en las plantas de trébol blanco (Figura 67). Como ya se ha descrito en el capítulo anterior, la cepa silvestre ANU843 induce la formación de nódulos piriformes de color rosa, indicativos de que la fijación de nitrógeno se está llevando a cabo en las raíces de trébol (Figura 67A). Sin embargo, en las plantas inoculadas con la cepa ANU843C2⁺ se observó que aproximadamente el 30% de las estructuras nodulares estaban aparentemente infectadas pero no mostraban una morfología realmente piriformes sino que tenían un aspecto aberrante, mostrando una histología externa levemente desorganizada e, incluso en algunos casos, una marcada necrosis caracterizada por la coloración marrón oscuro de la zona de infección (Figura 67 E).

El análisis de las imágenes de microscopía confocal de los nódulos aberrantes inducidos por la cepa ANU843C2⁺ marcada con una proteína verde fluorescente, reveló que los tejidos internos de estos nódulos están colonizados por la cepa superproductora de la celulasa CelC2 (Figura 67 F). Sin embargo, la disposición de las bacterias en su interior parece desordenada y dispersa y difiere de la observada durante la colonización interna de los nódulos por parte de la cepa silvestre (Figura 67 B).

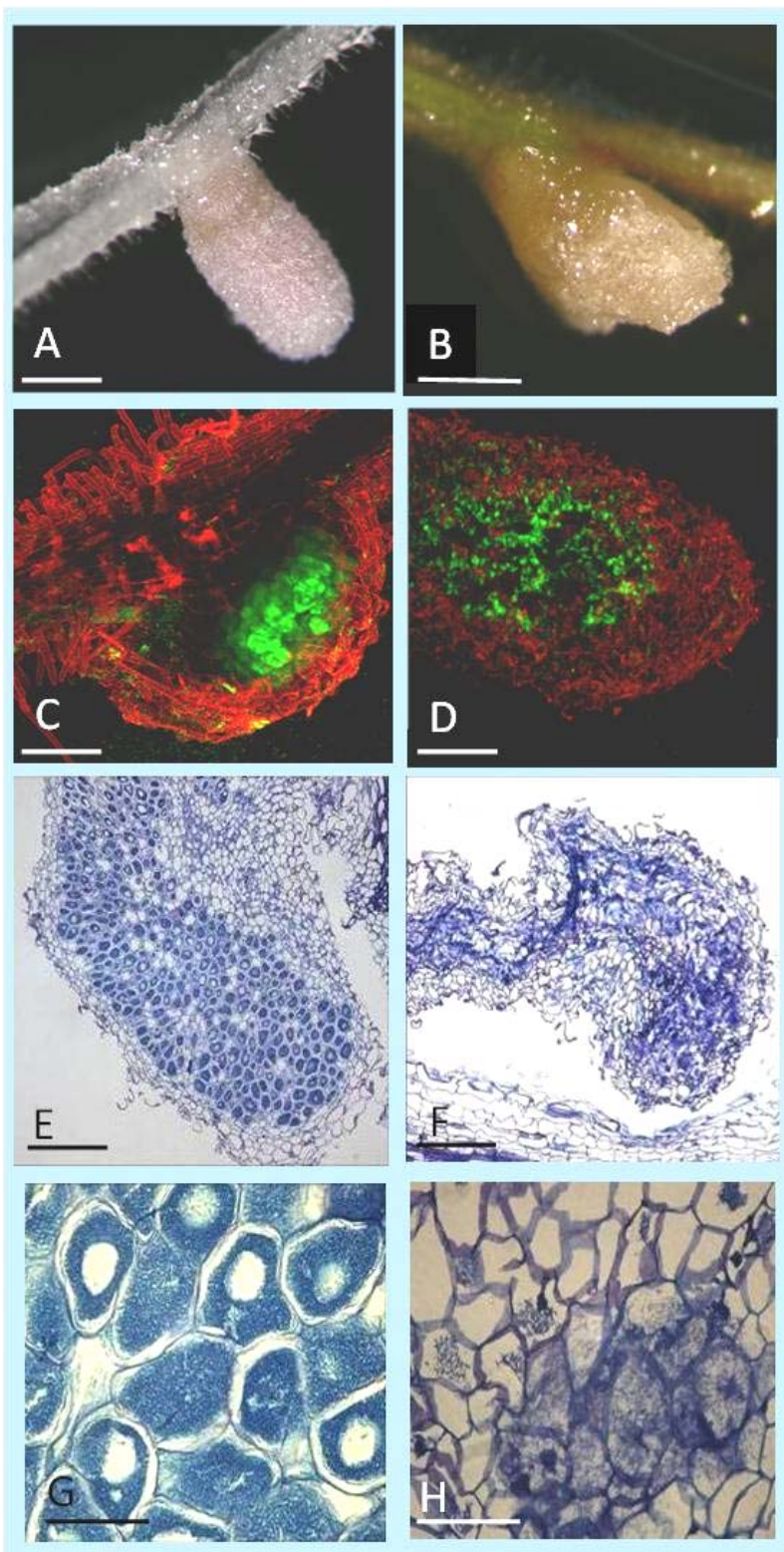


Figura 67. Desarrollo nodular (Nod) de plantas representativas de trébol blanco 40 días después de ser inoculadas con la cepa silvestre ANU843 (A, C, E, G) y superproductora del gen *celC* ANU843C2⁺ (B, D, F, H). Se muestran por un lado zonas de la raíz que presentan nódulos (A, B), microscopía confocal de nódulos teñidos con yoduro de propidio y ocupados por bacterias marcadas con proteínas fluorescentes (C, D) y secciones longitudinales de estos (E- H). Escalas 1 mm (A, B); 300 μ m (C, D); 500 μ m (E, F) y 100 μ m (G, H).

Para analizar con más detalle el efecto simbiótico de la sobreproducción del enzima CelC2 se llevaron a cabo cortes histológicos de los nódulos. Mediante microscopía de campo claro de secciones longitudinales de los nódulos que aparecen en plantas inoculadas con la cepa silvestre se pudo observar de nuevo la histología típica de los nódulos indeterminados (Figura 67 C), donde se aprecia claramente que las células de la planta se encuentran ocupadas por bacteroides homogéneamente diferenciados (Figura 67 D). Sin embargo, los nódulos aberrantes que aparecen en algunas plantas inoculadas con la cepa ANU843C2⁺ muestran estructuras internas totalmente desorganizadas (Figura 67 G) que contienen bacterias indiferenciadas en la parte distal de la zona de infección (Figura 67 H). Estos resultados concuerdan con los obtenidos al analizar las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión en las que se observa de la ausencia de simbiosomas en el interior de nódulos inducidos por la cepa ANU843C2⁺ (Figura 65).

Aún así, en más de la mitad de las plantas de trébol inoculadas con la cepa que sobreexpresa la celulasa C2, aunque presentaran algunos nódulos aberrantes aparentemente inefectivos, también aparecían nódulos aparentemente efectivos. Por otro lado, al comparar las plantas al final de los primeros ensayos *in vitro*, se observó que aquellas inoculadas con la cepa superproductora de la celulasa CelC2 presentaban una ligera disminución en el número de nódulos a lo largo del experimento y que el porcentaje de plantas capaces de fijar nitrógeno era menor. Para estudiar si estos efectos son acumulativos o se ven incrementados al aumentar la cantidad de microorganismos en el medio, se decidió llevar a cabo ensayos con distintas cantidades de inóculo: 1 ml a D.O._{600nm}: 0,5 (1X), 1,0 (2X) y 1,5 (3X).

En primer lugar, se comprobó que las plantas inoculadas con la cepa silvestre a distintos tamaños de inóculo no presentan diferencias en ninguno de los parámetros estudiados. Por ello, y para simplificar los análisis, se han representado a continuación las plantas inoculadas con la cepa silvestre a D.O._{600nm}: 0,5 (1X) y a distintas concentraciones con la cepa superproductora de la celulasa CelC2 (Figuras 68 y 69). El análisis del fenotipo simbiótico de estas cepas concluyó con la observación de un incremento en las diferencias observadas tanto en el proceso de nodulación como en el desarrollo vegetal entre la cepa silvestre y la superproductora a medida que aumentaban las concentraciones de inóculo (Figuras 68 y 69).

Los estudios de cinética de nodulación muestran cómo el número de nódulos aumentó progresivamente hasta aproximadamente los 30 días de cultivo. El número medio de nódulos por planta a lo largo del experimento fue ligeramente superior en la cepa silvestre que en la superproductora de la celulasa CelC2, haciéndose más notables las diferencias entre los valores medios especialmente a partir de las dos semanas tras la inoculación y a medida que la densidad de inóculo de la cepa superproductora aumentaba (Figura 68 A). El número medio de nódulos por planta al final del experimento fue mayor en la cepa de tipo silvestre, pero la diferencia en los valores promedio con respecto a la cepa

ANU843C2⁺ no fue estadísticamente significativa hasta que no se alcanzaron concentraciones de inóculo de D.O._{600nm}: 1,5 (3X) según el test LSD protegido de Fisher para P = 0,05. No obstante, se observa una ligera tendencia a que el número medio de nódulos sea inferior a medida que se incrementa el tamaño de inóculo de la cepa superproductora con respecto a la cepa silvestre ANU843 (Figura 68 B).

Así, parece que efectivamente, el aumento de la producción de esta endoglucanasa podría estar relacionado con una menor capacidad de inducir la formación de nódulos en trébol, probablemente por algún mecanismo que esté afectando al proceso de señalización entre ambos simbiosis. Este posible efecto se estudiará a continuación mediante el análisis de marcadores de respuesta en la planta similares a los que se producen cuando detectan la presencia de patógenos y que pueden afectar a la nodulación. También se tratará ampliamente el efecto de la celulasa CelC2 en el proceso de señalización *Rhizobium-leguminosa* en el capítulo siguiente de esta memoria, utilizando *Medicago truncatula* como planta modelo ya que en trébol no se encuentran disponibles las construcciones necesarias para llevar a cabo este estudio.

Por otro lado, en estos experimentos también se determinó el porcentaje de plantas aparentemente capaces de fijar nitrógeno (Fix⁺, caracterizadas por la presencia de hojas verdes y un porte significativamente mayor al de los controles sin inocular), que resultó ser el que presentaban más del 90% de las plantas inoculadas con la cepa ANU843. Así, se observó cómo este parámetro se redujo del 57% (1X) al 50% (2X) y finalmente, al añadir un inóculo de la cepa ANU843C2⁺ un tamaño tres veces mayor, apenas se observaron plantas con un fenotipo Fix⁺ (15%) (Figura 68 C y figura 69). Paralelamente, el porcentaje de nódulos con morfología aberrante también se vio notablemente incrementado a medida que se aumentaba el inóculo, desde un 29,6% (1X) al 34,1% (2X) y finalmente, al añadir un inóculo de un tamaño tres veces mayor, la mayor parte de los nódulos presentaban una apariencia aberrante (85%) mientras que las plantas inoculadas con la cepa silvestre no presentan este fenotipo (Figura 68 D).

Por tanto, en los ensayos de nodulación se encontraron diferencias significativas en la morfología y modo de ocupación de algunos nódulos así como en la cinética y el número de nódulos totales y aberrantes en las plantas inoculadas con las cepas ANU843 y ANU843C2⁺, que se vuelven más evidentes a altas concentraciones de inóculo. Esto nos permite confirmar que la sobreexpresión del gen *celC* puede afectar significativamente a la capacidad de nodular trébol de la cepa *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843, alterando la organogénesis de los nódulos ya que se encuentran invadidos por células indiferenciadas tras su liberación del canal de infección sin membrana peribacteroidea.

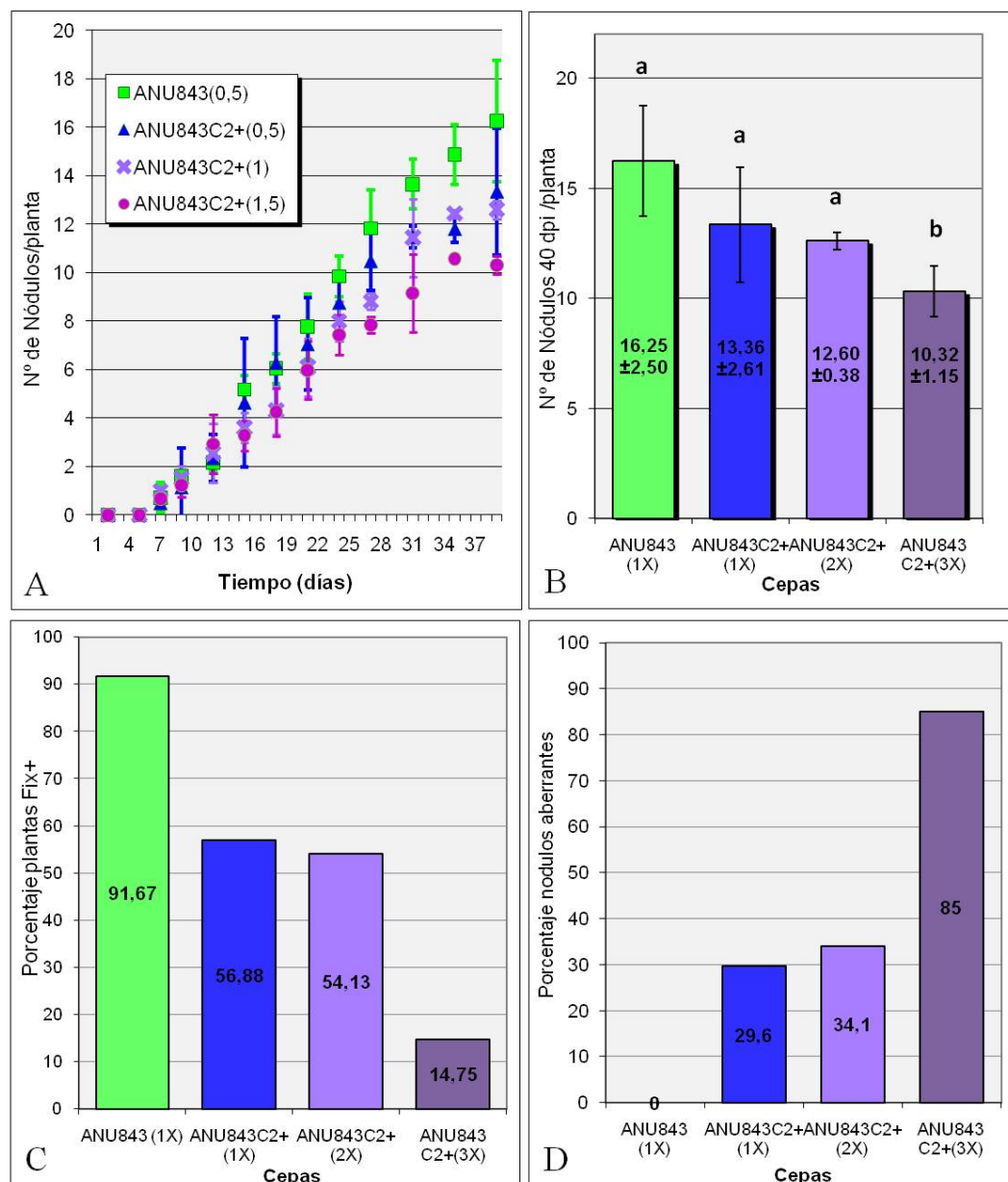


Figura 68. Parámetros de nodulación de plantas de trébol blanco inoculadas con las cepas ANU843, ANU843C2⁺ con distintas cantidades de inóculo: 1 ml a D.O._{600nm}: 0,5 (1X); 1,0 (2X) y 1,5 (3X). A) Cinética de nodulación. B) Número de nódulos por planta al final del ensayo. C) Porcentaje de plantas Fix⁺. D) Porcentaje de nódulos aberrantes. Las plantas se cultivaron en cultivo hidropónico en ausencia de nitrógeno durante 40 días. Los valores representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes, cada uno de los cuales se llevó a cabo con al menos 12 plantas.

2.2.2.2 Desarrollo de las plantas y fijación de nitrógeno (Fix)

Como ya se ha señalado anteriormente, en los ensayos monoxénicos de nodulación se puede apreciar que las plantas de trébol crecidas en presencia de su hospedador habitual, la cepa ANU843, se desarrollan y crecen con normalidad en un medio carente de nitrógeno mientras que un porcentaje considerable de las plantas que fueron inoculadas con la cepa ANU843C2⁺, que sobreexpresa la celulasa C2, presentan un desarrollo inferior que denota que se ve comprometida

la capacidad de fijar nitrógeno, especialmente a medida que el tamaño de inóculo se incrementa (Figura 68 C y figura 69 A).

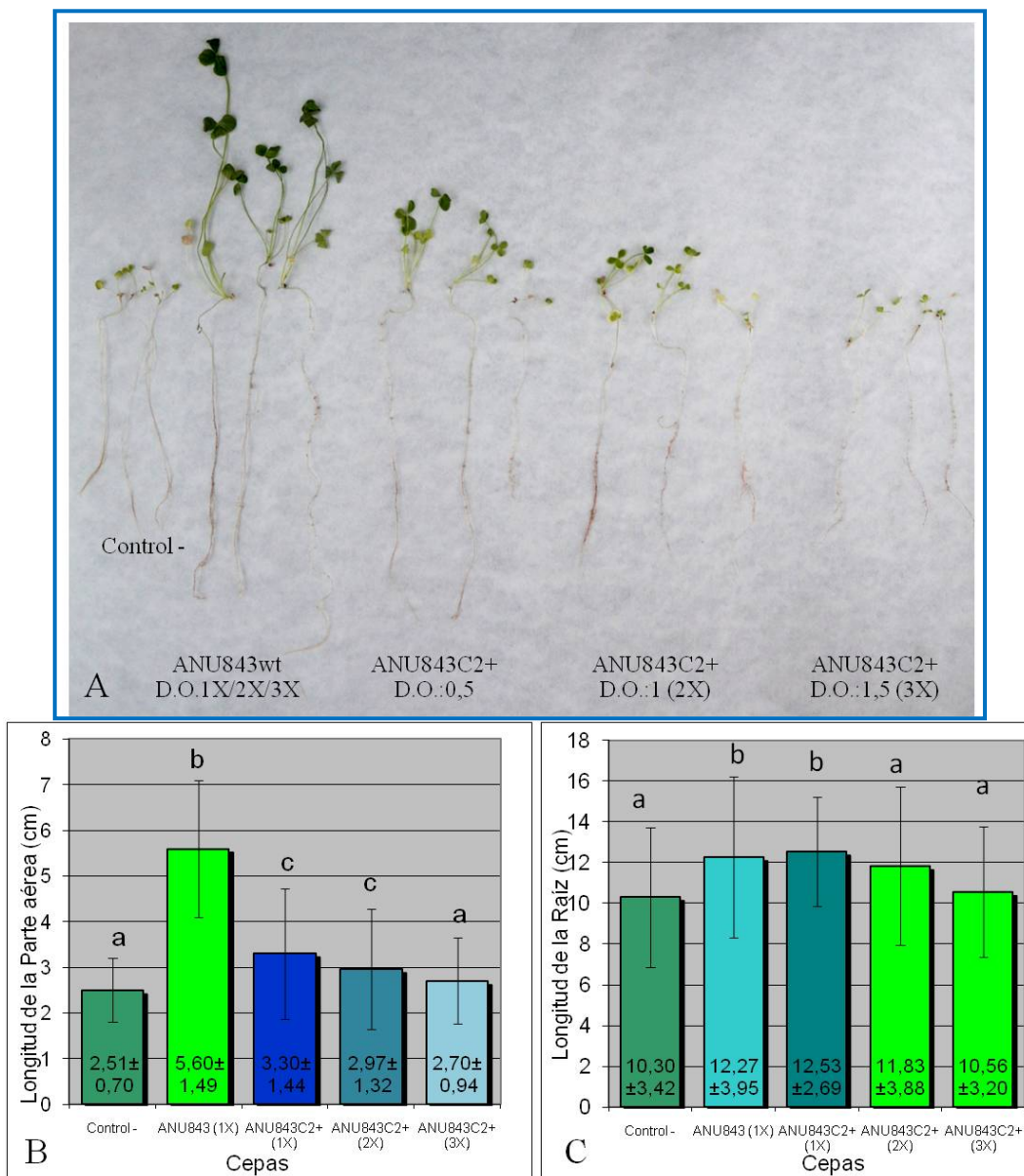


Figura 69. Fenotipo de trébol blanco sin inocular (Control-) y después de ser inoculadas con las cepas ANU843 y ANU843C2⁺ a distintas concentraciones de inóculo (DO_{600nm}: 0,5; 1,0 y 1,5). A) Fotografía de plantas representativas al final del ensayo. (B) Longitud de la parte aérea y (C) de la raíz. Las plantas se cultivaron en tubos ausencia de nitrógeno durante 40 días. Los datos que se presentan son los valores medios representativos de tres experimentos independientes y su correspondiente desviación estándar. Cada uno de los experimentos se llevó a cabo con al menos 12 plantas. Para cada parámetro, los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente según el test LSD protegido de Fisher para P = 0,05.

Para cuantificar estas diferencias, se tomaron medidas de la longitud de la parte aérea y de la raíz de las plantas representativas de tres experimentos independientes y se analizaron los datos obtenidos mediante el test de Fisher. Como era de esperar, se encontraron diferencias significativas entre la longitud de la parte aérea de las plantas inoculadas con las cepas ANU843 y ANU843C2⁺, cuyo porte, a su vez, no mostró diferencias significativas con el control negativo sin inocular cuando eran inoculadas a una D.O._{600nm}:1,5 (3X) (Figura 69 B). Estos resultados confirman que la simbiosis entre la cepa ANU843C2⁺ y *Trifolium repens* es menos efectiva en la fijación de nitrógeno. Por otro lado, la longitud de la raíz de las plantas inoculadas con las distintas cepas de estudio difirió significativamente entre ellas a partir de D.O._{600nm}: 1,0 (2X) (Figura 69 C).

Como se ha expuesto en el capítulo anterior, el cultivo hidropónico de plantas en medio monoxénico resulta limitante para comparar el potencial fijador de nitrógeno real de distintas cepas por la limitación del desarrollo de la planta. Por ello, para evaluar mejor la eficiencia fijadora de las cepas de estudio en ausencia de nitrógeno y compararlo con el crecimiento de trébol en presencia de este elemento, se llevaron a cabo ensayos en invernadero con las cepas ANU843 y ANU843C2⁺ en dichas condiciones. Los datos obtenidos de la longitud de la parte aérea y radicular, peso seco y contenido en nitrógeno de la parte aérea de plantas inoculadas con estas cepas silvestre se muestran en la figura 70.

Los resultados obtenidos para todas las determinaciones muestran que los valores relativos a las plantas inoculadas con la cepa ANU843C2⁺ fueron significativamente inferiores a las inoculadas con la cepa silvestre con un nivel de confianza del 99%, superior al obtenido en los ensayos en cultivo hidropónico en tubo. Hay que destacar que los datos obtenidos, especialmente en el peso seco y el contenido en nitrógeno, incluso son similares a los que se obtienen con las plantas que no están inoculadas, signo claro de la gran deficiencia fijadora de nitrógeno que presenta la cepa ANU843C2⁺ (Figura 70).

La figura 71 muestra las notables diferencias entre plantas representativas inoculadas con la cepa silvestre ANU843 y con la cepa recombinante ANU843C2⁺, que presentaron un aspecto amarillento y un desarrollo más limitado por la falta de nitrógeno en el medio y su mermada capacidad de fijarlo ya que, comparado con el desarrollo de las plantas crecidas en las mismas condiciones pero en presencia de nitrógeno, se observa como efectivamente no se ve afectado su crecimiento ya que no existen diferencias significativas en el desarrollo de las plantas inoculadas con las cepas ANU843 y ANU843C2⁺ bajo estas condiciones (datos no mostrados).

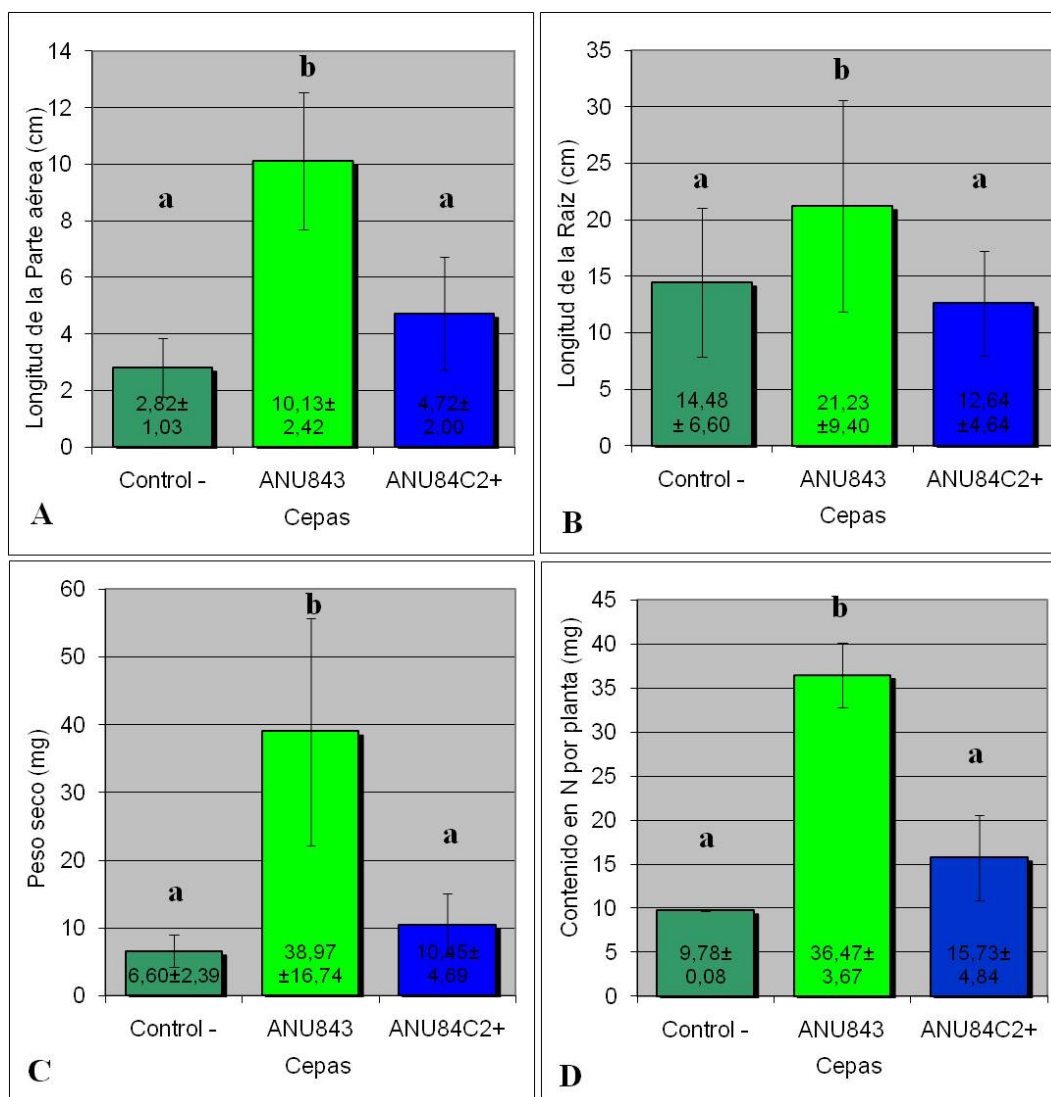


Figura 70. Eficiencia fijadora de las cepas de estudio determinada mediante la longitud de la parte aérea (A), de la raíz (B), peso seco (C) y contenido en nitrógeno medio (D) de las plantas de trébol (*Trifolium repens*) sin inocular (Control-) e inoculadas con las cepas ANU843 y ANU843C2⁺ en ensayos de invernadero. Las plantas se cultivaron en ausencia de nitrógeno durante 90 días. Los datos que se presentan son los valores medios representativos de dos experimentos independientes y su correspondiente desviación estándar. Cada uno de los experimentos se llevó a cabo con al menos 24 plantas. Para cada parámetro, los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente según el test LSD protegido de Fisher para P = 0,01.

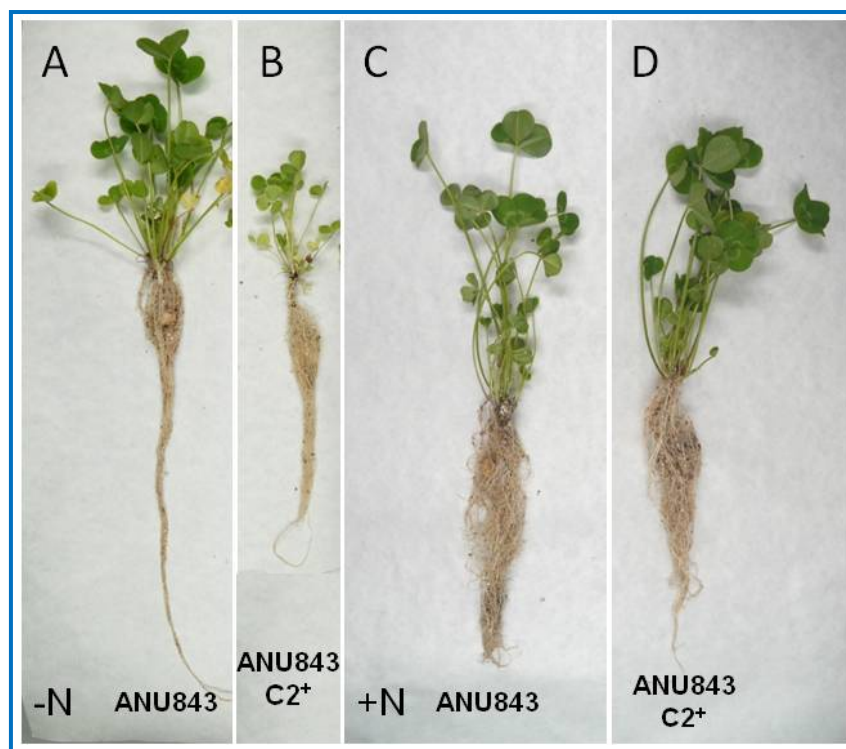


Figura 71. Fenotipo final (Fix) de plantas de trébol blanco 90 días después de ser inoculadas con la cepa silvestre ANU843 (A, C) y la cepa ANU843C2⁺. Se muestra la apariencia final de plantas representativas en ausencia de nitrógeno (A, B) en comparación con el desarrollo normal en presencia de este elemento (C, D).

Los ensayos realizados muestran que tanto la cepa silvestre como la cepa superproductora de la celulasa CelC2 inducen la formación de nódulos en las raíces de trébol, pero como consecuencia de la degradación incontrolada de la pared celular al final del canal de infección que les conduce hasta los nódulos, las plantas de trébol inoculadas con los microorganismos que sobreexpresan la celulasa CelC2 muestran un gran número de nódulos aberrantes infectivos pero inefectivos que provoca que su desarrollo aéreo, radicular, peso seco y contenido en nitrógeno se asemeje al de los controles negativos sin inocular en ausencia de nitrógeno en el medio. Este comportamiento es provocado por la incapacidad del microorganismo de llevar a cabo su función fijadora de Nitrógeno en el nódulo debido a la incapacidad de formar los simbiosomas.

2.2.3. Ensayos de medida del grado de competitividad

Tras observar el fenotipo de la cepa recombinante superproductora de la celulasa CelC2 en la infección primaria y secundaria de su hospedador *Trifolium repens*, nos propusimos estudiar si los fenotipos observados en la cepa ANU843C2⁺ podrían tener algún efecto sobre su competitividad, es decir, sobre la capacidad de infectar un mayor o menor número de nódulos en presencia de la cepa silvestre. Para estudiar esta característica simbiótica se utilizó el plásmido pGUS3 (García-Rodríguez y Toro, 2000; van Dillewijn *et al.*, 2001) que confiere coloración azulada a las bacterias y por tanto también a aquellos nódulos

ocupados por la cepa que contiene este plásmido tras revelado con el sustrato correspondiente.

En primer lugar, se llevó a cabo la transformación de la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ANU843 con el plásmido pGUS3 y se seleccionó una cepa transformante capaz de crecer en presencia de kanamicina y que presentó coloración azulada en presencia del sustrato cromogénico X-gluc (Figura 72 A), a la que se denominó ANU843GUS. Posteriormente se llevaron a cabo ensayos de nodulación en tubo para comprobar que el fenotipo simbiótico de la cepa no se ve afectado y que efectivamente los nódulos adquieren coloración azul (Figura 72 B). También se observó que los nódulos inoculados con las cepas ANU843EV y ANU843C2⁺ permanecían blancos después de la tinción (datos no mostrados).

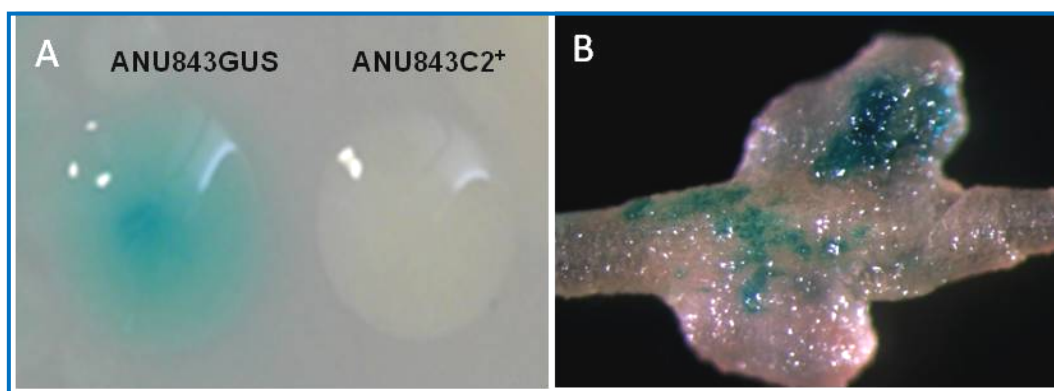


Figura 72. Comprobación de la obtención de la cepa ANU843GUS. A) Crecimiento en medio sólido YMA suplementado con Km y X-gluc para comprobar la coloración azulada en la cepa ANU843GUS y la ausencia de coloración en la cepa ANU843C2⁺. B) Nódulos de una raíz de trébol sometida a tinción con X-gluc a los 21 días de ser inoculada con la cepa ANU843GUS.

Para analizar la capacidad competitiva y los procesos de doble ocupación en las cepas de estudio, se inocularon bandejas con 28 plantas de trébol con una mezcla de ANU843GUS y ANU843EV en proporción 1:1. Una vez dado por finalizado el experimento, se realizó el recuento de nódulos piriformes parcial o totalmente azules y nódulos completamente blancos, es decir, aquellos ocupados por la cepa ANU843GUS y ANU843EV respectivamente (Figura 73 A, C), obteniendo un porcentaje similar para ambos, aunque ligeramente superior para la cepa marcada con el gen *gusA*. Estos resultados muestran que la competitividad de la cepa ANU843 no se vio comprometida al transformarla con el pGUS3 y que los procesos de doble ocupación de nódulos no son frecuentes en estas cepas.

Por otro lado, en los ensayos llevados a cabo en las mismas condiciones con las cepas ANU843GUS y ANU843C2⁺, la segunda resultó ser más competitiva ya que el porcentaje de nódulos blancos ocupados por la cepa ANU843C2⁺ (76%) fue significativamente superior al de nódulos azules ocupados por ANU843GUS (Figura 73 B, C).

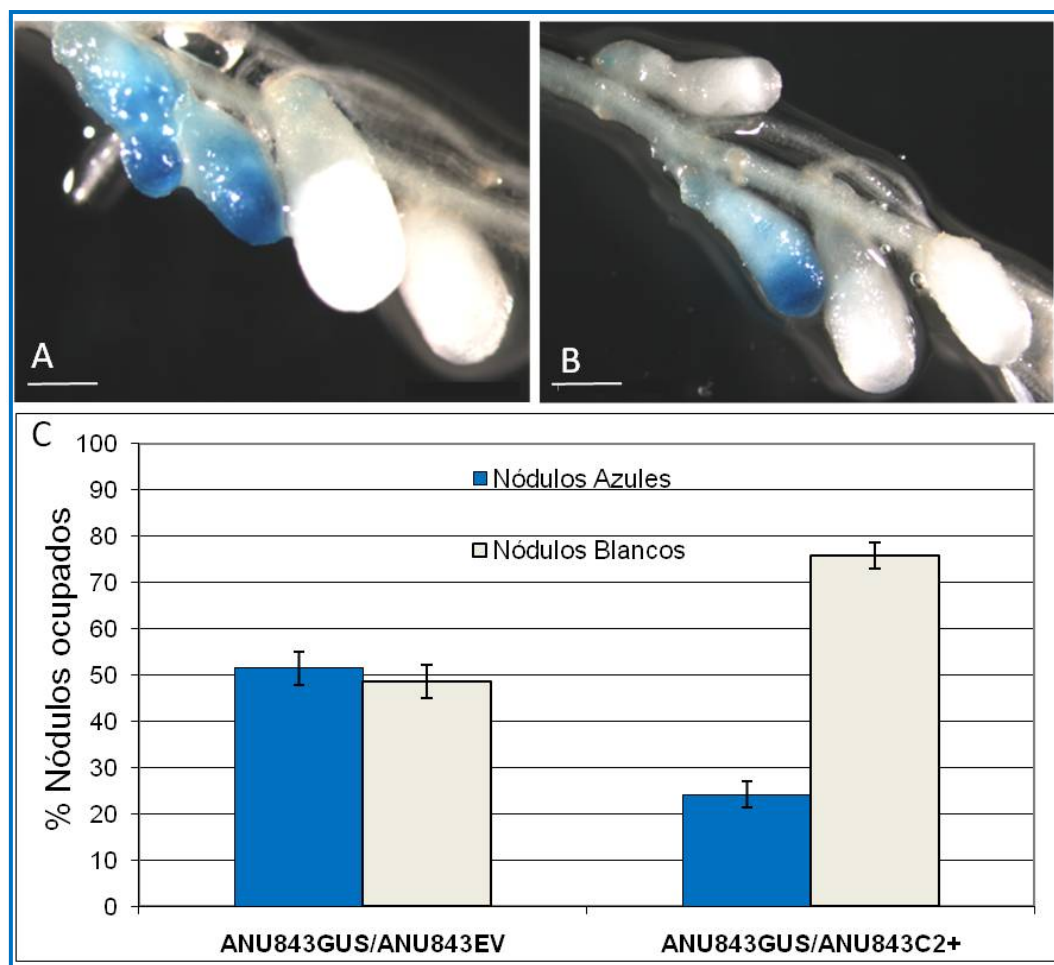


Figura 73. Capacidad competitiva de cepas de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. En A) se muestra una imagen representativa del porcentaje de nódulos blancos en plantas de trébol coinoculadas con ANU843GUS/ANU843EV en una proporción 1:1 y en B) con ANU843GUS/ANU843C⁺. Escala 1 mm. La gráfica representa el porcentaje de ocupación de nódulos de las respectivas coinoculaciones. Los valores corresponden a la media de 3 experimentos con 28 plantas cada uno. Las barras muestran el error estándar.

Por tanto, la sobreexpresión del gen *celC* conlleva un aumento de la competitividad de esta cepa, es decir, del número de nódulos ocupados. Este hecho puede ser debido a un aumento de la capacidad infectiva de la cepa superproductora de la celulasa CelC2, debido al incremento en su capacidad de hidrolizar la punta de los pelos radicales y el final de los canales de infección, como se ha observado en los análisis microscópicos descritos anteriormente.

2.2.4. Estudio de la respuesta de la planta

La detección de la falta de integridad de la pared celular puede ser uno de los mecanismos utilizados por las plantas para detectar el ataque de patógenos y activar distintas respuestas de defensa como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) o ácido salicílico (SA), con el objetivo de limitar la entrada de patógenos (Hematy *et al.*, 2009). Por otro lado, se conoce que otras

endoglucanasas también se encuentran involucradas en la invasión de las raíces de las plantas por bacterias patógenas como *Ralstonia solanacearum* (Saile *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos anteriormente y presentados en este capítulo sugieren que la sobreproducción de la celulasa CelC2 por *R. leguminosarum* bv. trifolii podría conducir a una pérdida de la integridad de la pared celular vegetal suficientemente grave como para activar las defensas de las plantas de trébol. Esto a su vez podría explicar el deterioro observado en el establecimiento de una simbiosis efectiva. Para probar esta hipótesis, se determinó y comparó la acumulación a lo largo del tiempo de SA y ROS en plantas de trébol inoculadas con la cepa ANU843EV o la cepa superproductora de CelC2.

.2.2.4.1 Producción de ácido salicílico (SA)

El ácido salicílico (SA) es un compuesto fenólico que regula el crecimiento vegetal y además está involucrado en la resistencia sistémica de plantas ante el ataque de los patógenos. Para evaluar si tras la inoculación con la cepa superproductora de la celulasa CelC2 se producía una acumulación de SA en las raíces de trébol se tomaron muestras sin inocular e inoculadas con las cepas ANU843EV y ANU843C2⁺ a distintos tiempos y se determinó la cantidad de ácido salicílico total y libre presente en las mismas mediante cromatografía HPLC de los extractos obtenidos.

En la figura 74 se muestran cromatogramas representativos de extractos fenólicos procedentes de raíz de trébol y sometidos a digestión con β -glucosidasa para determinar SA total. En los distintos extractos pudo observarse la aparición de un pico que eluía en torno a los 11,6 minutos, tiempo al cual eluye en nuestras condiciones cromatográficas, una muestra de SA patrón puro. El aumento proporcional del área de este pico en el cromatograma de un extracto fenólico de trébol al que se le ha adicionado una cantidad conocida de SA patrón, sugiere que también en la muestra vegetal, dicho pico se corresponde con SA (Figura 74A y C).

Una vez estudiado el perfil de fenoles de las muestras de trébol e identificado el pico correspondiente al SA, nos propusimos comparar dichos patrones y calcular la concentración de SA integrando el área de los picos en extractos de raíces de trébol sin inocular e inoculadas con las cepas de estudio recogidas tras 6, 12, 48 y 120 horas del tratamiento correspondiente. Los resultados se muestran en la tabla 26. Cabe destacar que las diferencias obtenidas entre el tratamiento sin inocular y el inoculado con la cepa ANU843C2⁺ parecen confirmar que en las plantas de trébol no se produce un incremento significativo en la acumulación de SA al ser inoculadas con un rizobio compatible, en este caso la cepa *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843, tal y como ocurre en otras simbiosis (revisado en Soto *et al.*, 2009).

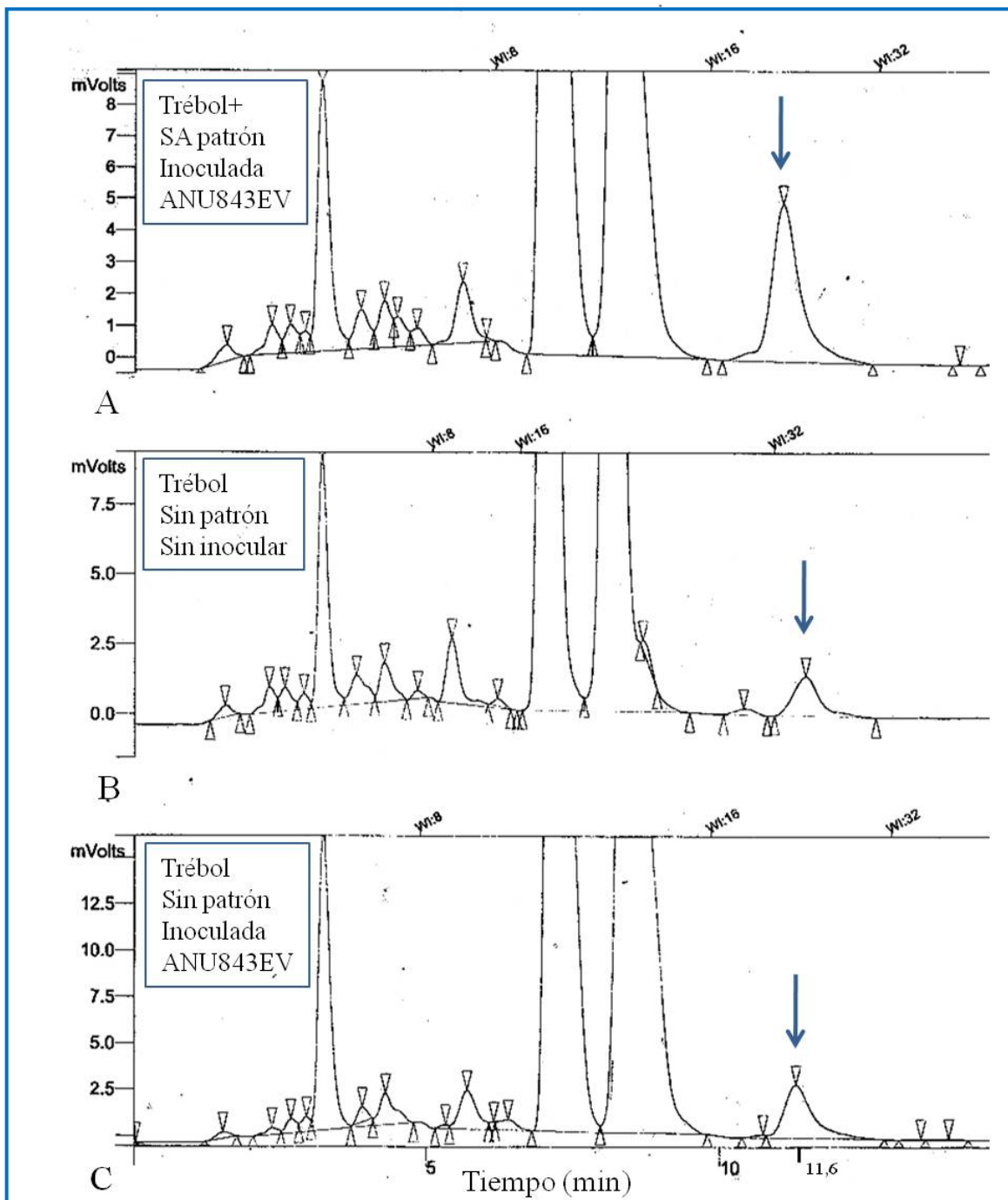


Figura 74. Perfil de fenoles obtenido tras someter a cromatografía líquida extractos obtenidos a partir de raíces de *Trifolium repens* sometidas a diversos tratamientos. A) Raíz de trébol inoculada con la cepa ANU843EV a la que se le ha añadido ácido salicílico patrón (Sigma) B) Raíz de trébol sin inocular C) Raíz de trébol inoculada con la cepa ANU843EV. Las flechas azules señalan el pico correspondiente al ácido salicílico.

Tabla 26. Concentración de ácido salicílico libre y total por gramo de peso fresco (FW) de raíz en muestras obtenidas a partir de raíces de trébol sin inocular e inoculadas con las cepas ANU843EV y ANU843C2⁺ tras 6, 12, 24 y 48 horas de ser inoculadas.

| Concentración (ng SA/g FW raíz) SA Libre/SA Total | tiempo (horas post inoculación) | | | |
|---|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | 6 | 12 | 48 | 120 |
| No inoculada | 16,56/36,57 | 10,12/30,27 | 16,74/22,14 | 47,08/62,95 |
| ANU843EV | 11,84/42,04 | 13,84/40,82 | 17,74/26,61 | 46,72/54,76 |
| ANU843C2 ⁺ | 11,57/55,85 | 13,38/35,12 | 13,41/15,29 | 45,99/40,14 |

Por otro lado, tampoco se observa ningún patrón que refleje un aumento significativo en la acumulación de ácido salicílico por parte de la cepa superproductora de la celulasa CelC2 en ninguno de los tiempos en los que fue llevado a cabo el estudio. Por tanto, podemos afirmar que la cepa ANU843C2⁺ no aumenta significativamente la producción de ácido salicílico al ser inoculado en trébol. Este hecho puede ser explicado debido a que, pese a que esta cepa tiene incrementada la producción de celulasas y degrada las paredes vegetales de forma masiva en los puntos de infección, la producción simultánea de los factores de nodulación enmascara este efecto de forma que no resulta suficientemente severo como para activar una respuesta defensiva en la planta mediada por ácido salicílico que aborte el proceso.

.2.2.4.2 Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Bajo el término de “especies reactivas de oxígeno” (*reactive oxygen species, ROS*) se agrupa un conjunto de sustancias como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el anión superóxido (O₂⁻) y los radicales hidroxilo (OH[•]) (Revisado por Chang *et al.*, 2009). Estas sustancias modulan distintos procesos fisiológicos en las plantas, entre ellos la respuesta defensiva, y pueden ser localizadas en distintas células de la raíz (*Ver apartado 4.3.2. de la introducción*). Estudios previos muestran que durante una simbiosis compatible las plantas de trébol inducen un moderado pulso oxidativo de corta duración localizado en el lugar donde comienza la infección primaria en una simbiosis compatible con la cepa ANU843, mientras que es más intenso y prolongado en las interacciones incompatibles (Salzwedel y Dazzo, 1993). Por otro lado, la ausencia de producción de ROS por parte de la planta puede provocar deficiencias en la nodulación y la fijación de N₂ (Soto *et al.*, 2006), lo que parece indicar que un pequeño pulso oxidativo es necesario para que progrese la simbiosis.

Para determinar si la inoculación con la cepa CelC2⁺ incrementa el pulso oxidativo en la planta de manera que pueda repercutir a su vez en las deficiencias observadas en la nodulación, nos propusimos comprobar la acumulación de ROS a diferentes tiempos tras la inoculación de *Trifolium repens* con las cepas

Rhizobium leguminosarum bv. trifolii ANU843EV y ANU843C2⁺ utilizando el marcador fluorescente 2', 7'-diclorodihidrofluorescein diacetato (H₂DCFDA). Este compuesto permite detectar la producción de ROS en diferentes células vegetales, ya que es oxidado por estas especies reactivas de oxígeno formando un compuesto detectable por microscopía de fluorescencia (Ubezio *et al.*, 1994).

En primer lugar, llevamos a cabo la cuantificación del porcentaje de pelos radicales que presentaron respuesta ROS en cada planta tras cortos periodos de tiempo (1, 2, 6 y 12 horas) y tras periodos más prolongados (1, 2, 5, 6, 10, 15, 25 y 38 días) posteriores a la inoculación con las cepas de estudio y con plantas no inoculadas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 75, donde podemos apreciar cómo incluso las plantas no inoculadas muestran un pequeño porcentaje de pelos con respuesta ROS (generalmente entre el 1 y el 5%), que puede ser debida a las propias condiciones del tratamiento *in vitro* y a la manipulación de las plantas para someterlas a microscopía o a que en estos pelos se esté produciendo algún proceso fisiológico en el que estas moléculas intervengan (Figura 76F) (Chang *et al.*, 2009). Sin embargo, este porcentaje en ningún caso supera al observado en plantas inoculadas.

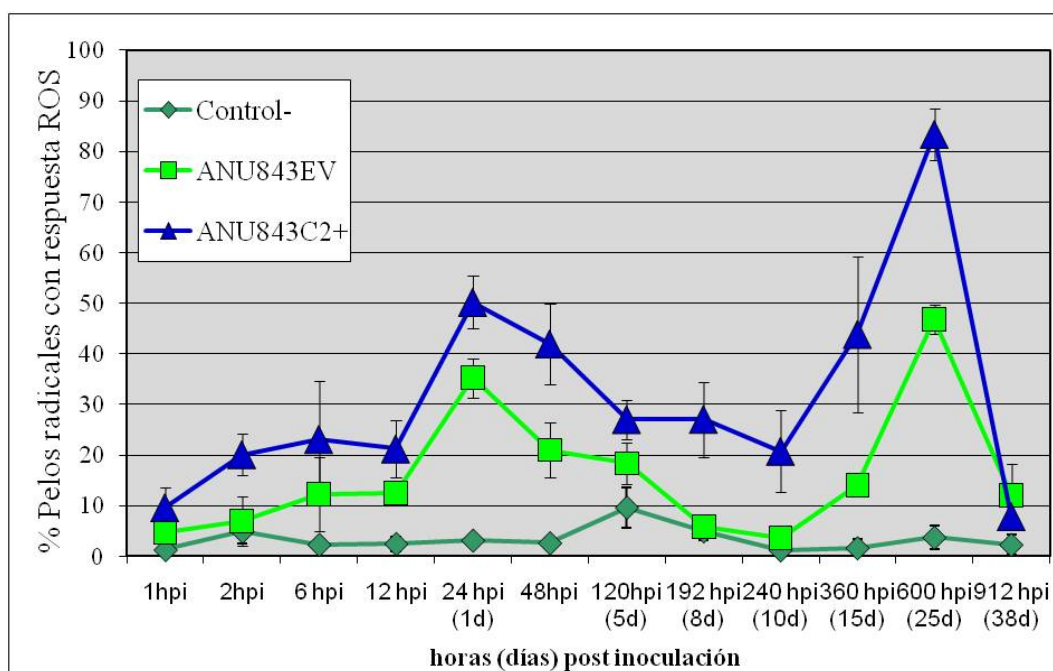


Figura 75. Porcentaje de pelos radicales de *Trifolium repens* que presentan respuesta ROS tras diferentes periodos de tiempo post-inoculación con las cepas ANU843EV y ANU843C2⁺ o sin inocular.

Como podemos observar, la cepa ANU843EV induce un pulso oxidativo en los pelos radicales de la planta poco después de entrar en contacto con ésta que va aumentando poco a poco entre 1 y 12 horas postinoculación y es mayor a las 24 hpi, donde afecta al 30% de estas células. A partir de este momento, el porcentaje de pelos afectados disminuye hasta prácticamente desaparecer entre los 8-10 días (Figura 75 y 76D) y vuelve a aumentar a partir de los 15 días, con un nuevo pico a los 25 días post inoculación, posiblemente debido a las condiciones de estrés a las

que está sometida la planta derivadas del cultivo *in vitro* en presencia de la bacteria.

El patrón temporal de los primeros signos de pulso oxidativo observados es similar al de la actividad peroxidasa descrita previamente en trébol tras la inoculación con la cepa ANU843 (Salzwedel y Dazzo, 1993). Por otro lado, aunque no existen estudios de respuestas ROS en trébol a periodos de tiempo más prolongados postinoculación, el comportamiento bifásico de la activación del pulso oxidativo observado también es similar al que se ha descrito anteriormente en la infección compatible *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago truncatula*, en la que se ha observado una débil y transitoria acumulación de ROS durante los pasos iniciales de la interacción entre los rhizobia y leguminosas (Santos *et al.*, 2001) y una posterior acumulación 12 h tras el tratamiento con factores de nodulación, lo cual posiblemente se encuentre asociado a la cascada de transducción de señales (Ramu *et al.*, 2002). Los resultados también nos muestran que hay signos de pulso oxidativo en los últimos estadios del proceso simbiótico.

Por otro lado, la producción de ROS en las plantas por parte de la cepa ANU843C2⁺, sigue una distribución temporal similar a la de la cepa ANU843EV (Figura 75). Sin embargo, podemos observar como el número medio de pelos radicales donde se observó la producción de ROS fue ligeramente superior (incrementos entre un 5 y un 20%) en las plantas sometidas al tratamiento con la cepa ANU843C2⁺ que en aquellas inoculadas con la cepa ANU843EV en todos los puntos temporales después de la inoculación analizados, especialmente a los 26 dpi (incremento del 30%). Estas diferencias se hacen especialmente perceptibles también a los 2 y 8 dpi (Figura 76 E), donde también son significativas.

Por tanto, se puede observar cómo tras las 24 hpi, el pulso oxidativo en plantas inoculadas con la cepa superproductora de la celulasa CelC2 no decae tanto como después de la inoculación con la cepa ANU843EV, mostrando que posiblemente la disminución de la producción de ROS mediada por los NF no es suficiente cuando la planta es inoculada con la cepa ANU843C2⁺ para superar la respuesta defensiva de la planta. Por otro lado, la subsiguiente acumulación de ROS observada a los 8 días tras la inoculación puede deberse también a que la cepa superproductora esté invadiendo una gran parte de los pelos radicales de forma masiva. Además, podemos observar como a nivel subcelular en algunos casos esta respuesta se localiza especialmente en el extremo terminal de los pelos radicales, coincidiendo con la distribución de las zonas susceptibles a ser hidrolizadas por la celulasa CelC2 (Figura 76 D). Estos resultados nos permiten afirmar que la fuente del excesivo pulso oxidativo puede ser esta enzima.

También podemos observar una producción más fuerte y prolongada de ROS en las células corticales y meristemáticas infectadas con la cepa ANU843C2⁺ en algunos puntos de muestreo (Figura 76B). Esta respuesta sistémica de la planta puede ser debida al reconocimiento de la bacteria como un agente patógeno, como resultado de la desregulación en la producción de celulasas o puede ser que el extremo terminal de la raíz, una de las zonas de elongación de la planta, al encontrarse en continuo crecimiento también contenga celulosa en forma no cristalina y, por tanto, sea otra de las dianas de acción de la celulasa CelC2.

Previamente ha sido descrita la localización en otras leguminosas de gran cantidad de H_2O_2 asociada con los bacteroides en la zona de senescencia del nódulo (zona IV) (Rubio *et al.*, 2004). Por ello, en este trabajo nos propusimos analizar la producción de ROS en los nódulos de trébol. Así, observamos leves signos de estrés oxidativo en las zonas de senescencia de los nódulos tras dos semanas de ser inoculados con la cepa ANU843EV (Figura 76 G), pero no en la zona de invasión de los mismos.

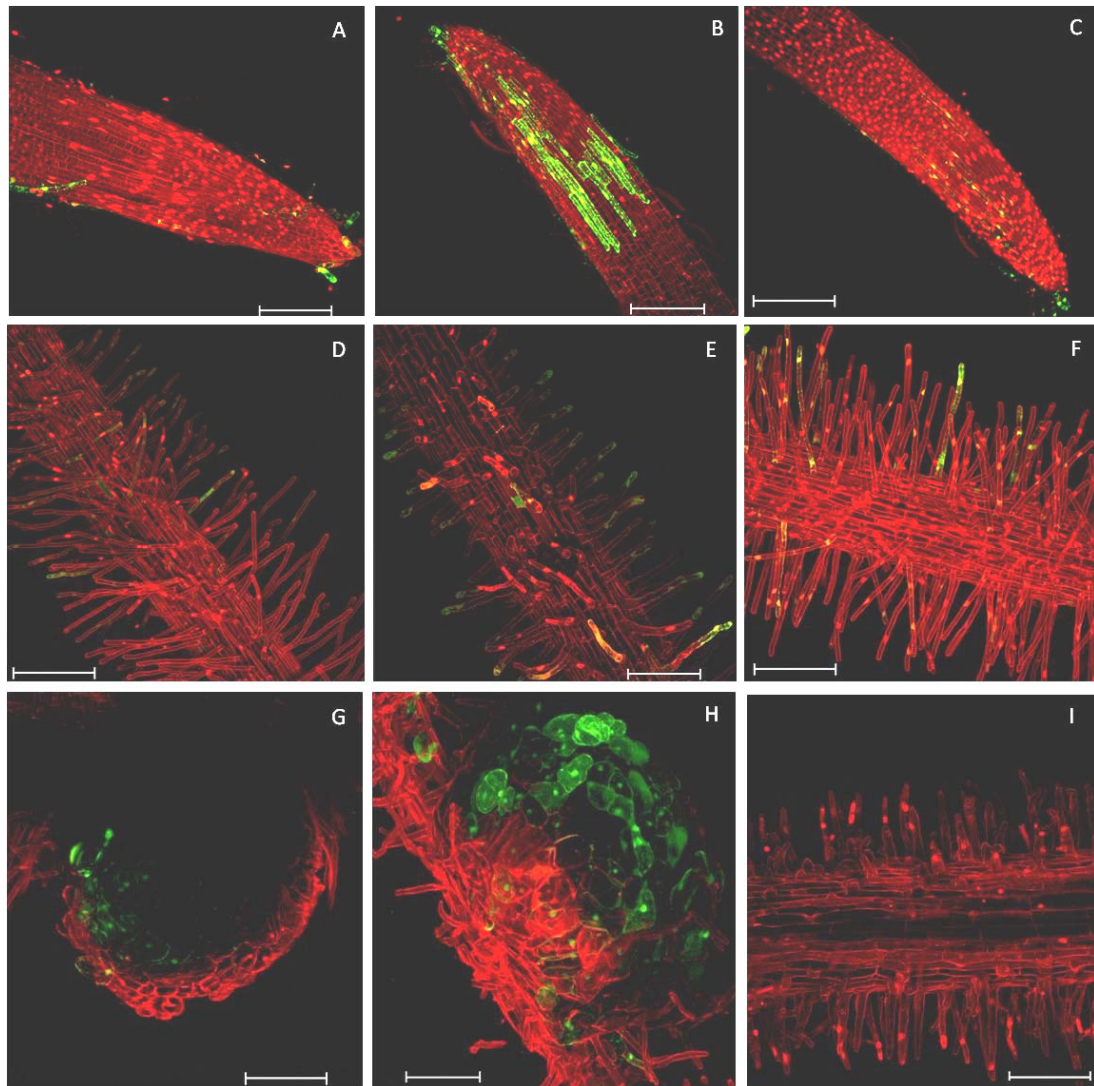


Figura 76. Microscopía confocal mostrando la producción de ROS en *Trifolium repens*. Las imágenes muestran el meristemo y los pelos radicales de plantas a los 8 días de ser inoculadas con las cepas ANU843EV (A, D), ANU843C2⁺ (B, E) o sin inocular (C, F); y los nódulos que aparecen en la cepa ANU843EV (G) y ANU843C2⁺ (H) en plantas 15 días tras la inoculación. I) La participación de la NADPH oxidasa en la producción de ROS en plantas inoculadas con ANU843C2⁺ fue comprobada mediante la adición de difenileno de iodonio (DPI). Las imágenes muestran un experimento representativo de una de las tres repeticiones biológicas llevadas a cabo. Escala 150 μ m.

Sin embargo, parece existir una mayor producción de ROS en la zona de invasión de nódulos ocupados por la cepa ANU843C2⁺ (Figura 76H), mostrando que la hidrólisis descontrolada de la zona no cristalina de la pared celular del canal de infección donde las bacterias son liberadas también puede estar relacionada con la producción de ROS. En ninguno de los casos se observa una respuesta en el interior de los nódulos utilizando esta metodología quizá debido a que el compuesto utilizado para su detección (H₂DCFDA) no difunda al interior de los nódulos, ya que mediante otras técnicas sí se ha descrito previamente la presencia de H₂O₂ en el interior de los nódulos (Rubio *et al.*, 2004).

Por último, se llevaron a cabo ensayos para comprobar si la señal fluorescente observada en las plantas podría efectivamente relacionarse con la respuesta ROS. Para ello se evaluó si esta respuesta era inhibida tras el tratamiento con difenileno de iodonio (DPI), un inhibidor del enzima NADPH oxidasa en la planta, que interviene en la síntesis de las especies reactivas de oxígeno (Mazel *et al.*, 2004). Así, se comprobó que efectivamente, la fluorescencia emitida por la planta era debida a la producción de ROS, ya que en presencia del inhibidor de la NADPH oxidasa la señal desaparece (Figura 76 I).

Todos estos datos apuntan hacia un incremento en la producción de ROS en aquellas zonas susceptibles de ser hidrolizadas por el enzima CelC2 en las plantas inoculadas con la cepa ANU843C2⁺. Este aumento en el pulso oxidativo ha sido también descrito en simbiosis incompatibles en *Trifolium repens* (Salzwedel y Dazzo, 1993). Sin embargo, no se produce una respuesta sistémica en la planta, lo cual se apoya por los datos obtenidos anteriormente al analizar la síntesis de ácido salicílico y observar la ausencia de incremento en los niveles de SA tras la inoculación por parte de la cepa recombinante superproductora de la celulasa CelC2. Por tanto, la planta percibe el exceso de producción de celulasas por parte de la bacteria, respondiendo con un ligero aumento en el pulso oxidativo que mantiene con el microorganismo simbiote, pero sin activar la respuesta oxidativa sistémica que aborte por completo el proceso simbiótico.

CAPÍTULO IV

Expresión heteróloga de la celulasa celC: efecto en el establecimiento de la simbiosis Sinorhizobium meliloti-Medicago y en el intercambio molecular de señales



CAPÍTULO IV: EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA CELULASA *celC*: EFECTO EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago* Y EN EL INTERCAMBIO MOLECULAR DE SEÑALES

Con el objetivo de conocer mejor la función de esta celulasa, a continuación se decidió llevar a cabo el estudio del efecto que podría tener en otro sistema simbiótico conocido. En este caso, se optó por la simbiosis *Sinorhizobium-Medicago* ya que es un sistema modelo ampliamente utilizado, del que actualmente se disponen multitud de herramientas genéticas. Por un lado, el genoma de la cepa *S. meliloti* 1021 se encuentra secuenciado y la simbiosis que establece con *Medicago sativa*, ampliamente caracterizada. Además, esta bacteria también es capaz de establecer simbiosis con *M. truncatula*, un organismo también ampliamente estudiado como modelo simbiótico en los últimos años y del que existen gran cantidad de construcciones disponibles para caracterizar distintas etapas del establecimiento de la simbiosis.

Así, por un lado se planteó la obtención de un transformante de la cepa *Sinorhizobium meliloti* 1021, que no contiene homólogos a la celulasa C2 en su genoma, que expresara el gen *celC* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* de forma heteróloga para analizar su capacidad infectiva, monitorizando su fenotipo simbiótico tanto en trébol como en alfalfa. Por otra parte, para estudiar la posible influencia de la celulasa CelC2 en el diálogo molecular *Rhizobium*-leguminosa, se utilizaron tanto estos recombinantes como la proteína purificada y se analizaron distintos marcadores que son utilizados en los estudios de la percepción de los factores de nodulación por parte de la planta, como los pulsos de calcio y la expresión de los genes de nodulación temprana, mediante plantas de *M. truncatula* transformadas con las construcciones apropiadas.

1. OBTENCIÓN DE LA CEPA RECOMBINANTE *Sinorhizobium meliloti* 1021C2⁺

La cepa seleccionada fue *S. meliloti* 1021 ya que su genoma ya ha sido secuenciado y no aparecen homólogos al gen *celC*. Además, para confirmar la ausencia del gen *celC* en su genoma, se procedió a realizar un estudio de hibridación “Southern Blot” utilizando como sonda la obtenida al amplificar la secuencia clonada en el plásmido pPMC2 con los “primers” C1F y C2R. Esta sonda presenta un único sitio de restricción del enzima *HindIII* y no presenta ningún lugar de corte para el enzima *Sall* (Figura 39, capítulo II). Estos enzimas fueron empleados para llevar a cabo la digestión del ADN genómico de la cepa de

estudio y de la cepa *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843, que en este caso sirvió como control positivo.

Como se mostró anteriormente, la hibridación dio como resultado la ausencia de señal en las digestiones del ADN genómico de la cepa *S. meliloti* 1021 y una y dos bandas con las digestiones *Sall* y *HindIII*, respectivamente del ADN genómico de la cepa ANU843 silvestre (Figura 40, capítulo II). Este resultado confirma que en el fondo genético de la cepa *S. meliloti* 1021 no existen homólogos a este gen tal y como se deduce de la búsqueda mediante el programa BLAST en su genoma. Por tanto a continuación se llevó a cabo la construcción de recombinantes de *S. meliloti* 1021 que sobrepresan la celulasa C2 con el fin de analizar su fenotipo simbiótico y compararlo con el de la cepa silvestre.

Para ello, esta cepa fue transformada con el vector pJZC2 (Figura 77), que expresa constitutivamente el gen *celC*, mediante conjugación triparental y posteriormente se seleccionaron aquellos transformantes que eran resistentes a 200 µg/ml de kanamicina. Los conjugantes se confirmaron mediante PCR del gen *celC*, utilizando ADN total de las cepas de estudio y los oligonucleótidos C1F y C2R, que generaron un fragmento correspondiente al gen *celC* del mismo tamaño al que se obtuvo al utilizar el ADN de la cepa de *R. leguminosarum* bv. trifolii como control (Figura 77). En este ensayo también se pudo comprobar la ausencia de amplificación en el carril correspondiente al ADN de *S. meliloti* 1021, que se utilizó como control negativo. La cepa obtenida se denominó 1021C2⁺ y posteriormente fue sometida a distintos ensayos de actividad enzimática para comprobar su capacidad de producción de actividad carboximetilcelulásica correspondiente a la celulasa CelC2.

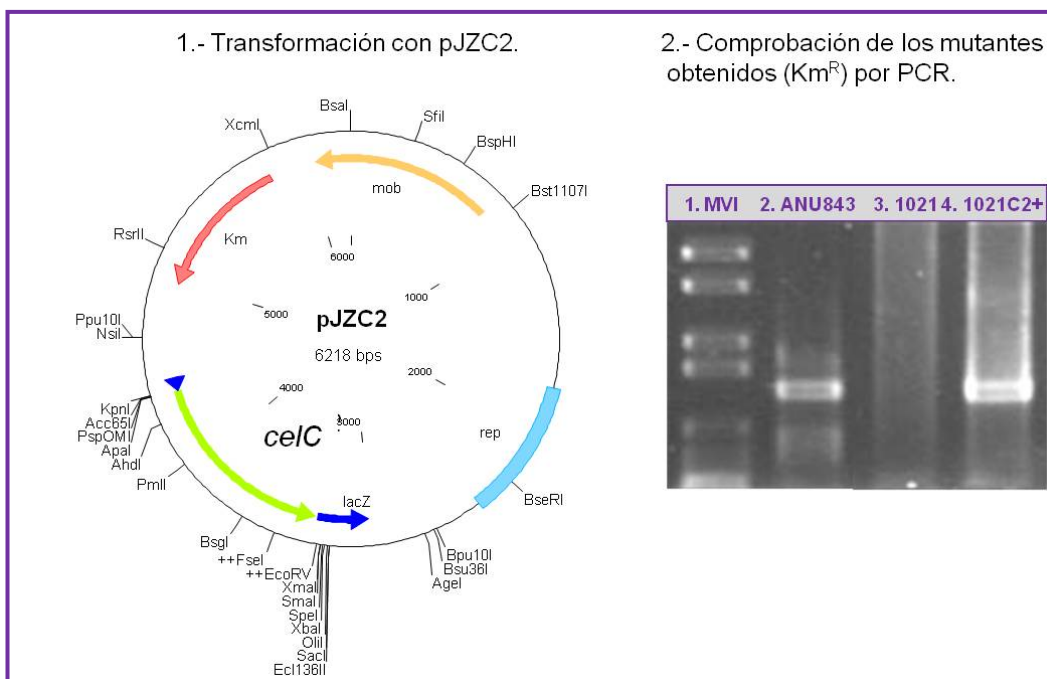


Figura 77. Estrategia de obtención de la cepa *S. meliloti* 1021C2⁺. A la izquierda se observa la construcción correspondiente al plásmido pJZC2 y a la derecha la comprobación de la complementación mediante PCR utilizando los “primers” C1F y C2R: el carril 2 corresponde a la cepa silvestre *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843, el carril 3 a *S. meliloti* 1021 y el carril 4 a la cepa 1021C2⁺. Se incluye el marcador MVI en el carril 1 cuyos tamaños de banda son 2176, 1760, 1230, 1033, 653, 517, 453 y 394 pb.

2. CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA OBTENIDA

2.1. Actividad celulolítica

A continuación se llevaron a cabo los ensayos enzimáticos utilizados anteriormente para determinar cualitativa y cuantitativamente la actividad celulolítica de la cepa silvestre y la cepa recombinante obtenida, con los que se pudo confirmar la presencia de actividad carboximetilcelulásica en los extractos sonicados de la cepa 1021C2⁺.

2.1.1. Ensayos de difusión en placa

Como primera aproximación, se llevó a cabo la comparación de la actividad celulolítica de las colonias de 1021 y 1021C2⁺, pudiendo observar cómo los cultivos celulares de la cepa 1021C2⁺ presentaban una hidrólisis superior a la que se observa en la cepa silvestre, que mostró signos de hidrólisis enzimática bastante débiles bajo estas condiciones de pH y temperatura (Figura 78 A), probablemente debido a que las condiciones para la detección del enzima CelC2 no son las óptimas para la detección de los enzimas celulolíticos presentes en la cepa 1021.

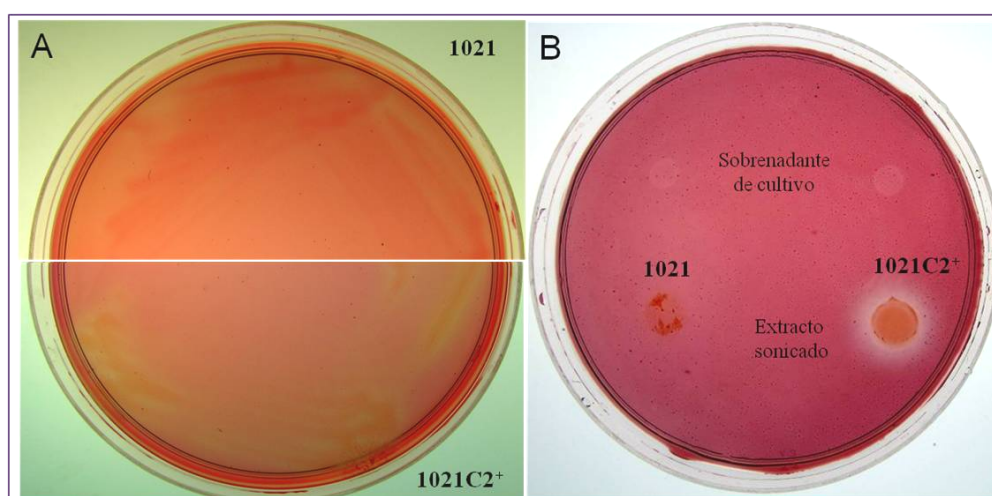


Figura 78. Ensayos de actividad carboximetilcelulásica de las cepas *S. meliloti* 1021 y 1021C2⁺. A) Ensayo de crecimiento en estría en medio YMA con CMC. B) Ensayo difusión radial en placa de los sobrenadantes de cultivo (parte superior) y los extractos celulares obtenidos por sonicación (parte inferior).

El ensayo con los sobrenadantes de cultivos celulares y extractos sonicados confirmó la expresión del gen *celC* en la cepa 1021C2⁺ ya que dio como resultado un halo apreciable de actividad celulasa (Figura 78 B). De nuevo, bajo las condiciones del ensayo óptimas para la actividad de la celulasa C2, no se observa actividad en la cepa silvestre 1021, sin embargo, no puede descartarse que

esta cepa produzca otras celulasas tal como se aprecia en la figura 78 A y se confirma en la secuencia de su genoma (*ver Capítulo I*).

A pesar de este exceso de producción, la mayor parte de la actividad carboximetilcelulásica detectada en 1021C2⁺ permanece asociada a la pared celular de las bacterias, ya que los resultados fueron siempre negativos cuando se utilizaron como soluciones enzimáticas las fracciones extracelulares (sobrenadantes de cultivo) de las mismas. Por tanto, el procesamiento y localización de los enzimas hidrolíticos en la cepa recombinante obtenida no se ha visto alterado, permaneciendo unidos a la célula.

2.1.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida y zimograma

A continuación, se llevó a cabo la detección de isoenzimas con actividad celulolítica en extractos celulares sonicados tras su separación mediante SDS-PAGE. En el caso de las proteínas contenidas en la fracción celular de la cepa 1021C2⁺, en el gel de poliacrilamida ya pudo observarse la acumulación de una proteína de un tamaño que coincidía con el que también se observa en la cepa ANU843C2⁺, de aproximadamente 31 KDa (Figura 79 A). Tras ser revelado para detectar la actividad celulolítica, se pudo ver claramente que la banda correspondiente a la proteína CelC2 que se observa en las cepas de *R. leguminosarum* bv. trifolii, también se detecta en el carril de la cepa 1021C2⁺, por lo que se deduce que efectivamente la construcción de la cepa recombinante ha sido satisfactoria (Figura 79 B).

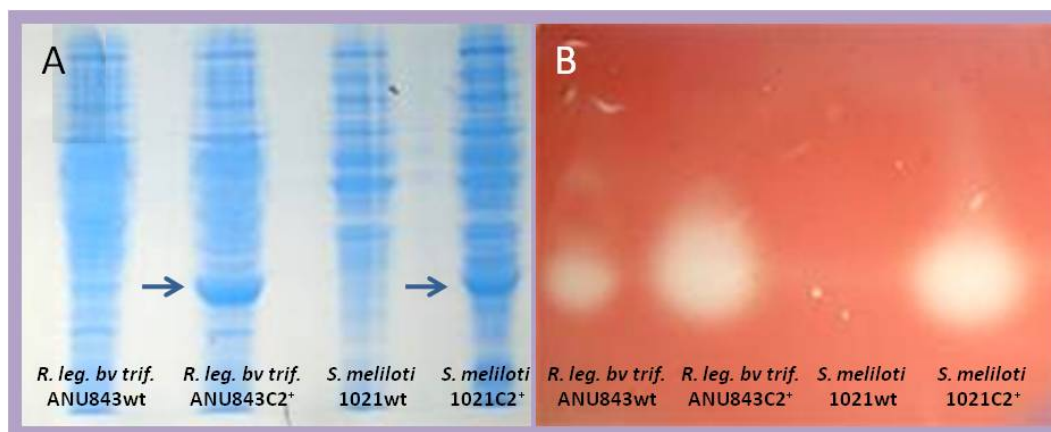


Figura 79. Electroforesis en gel de acrilamida (A) y zimograma de revelado sobre este gel para la detección de isoenzimas con actividad celulásica. Las flechas señala la acumulación de la proteína CelC2. (B) en extractos celulares de las cepas silvestres *R. leguminosarum* bv. trifolii (carril 1) y *S. meliloti* 1021 (carril 3) y los recombinantes ANU843C2⁺ (carril 2) y 1021C2⁺ (carril 4).

Mediante esta prueba además se puede confirmar que la celulasa CelC2 introducida en *S. meliloti* 1021 mediante transformación con el plásmido pJZC2 se expresa y procesa de la misma manera en la cepa transformada 1021C2⁺ que en *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843. Por el contrario, bajo las condiciones del ensayo, no se detecta actividad celulásica en *S. meliloti* 1021. Además, parece que

existe una sobreexpresión del gen *celC* en la cepa transformada, pero este hecho deberá confirmarse mediante el ensayo de cuantificación de actividad celulolítica por BCA.

2.1.3. Cuantificación de la actividad celulolítica

Este ensayo se llevó a cabo utilizando las mismas soluciones enzimáticas obtenidas previamente por sonicación y bajo las condiciones óptimas para la detección de la actividad celulásica de la celulasa CelC2. Los resultados revelan que la cepa 1021C2⁺ no sólo expresa de forma heteróloga la celulasa CelC2, sino que incrementa dicha actividad aproximadamente seis veces en comparación a la cepa silvestre de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Figura 80). Además, la actividad detectada es únicamente debida a la celulasa CelC2, ya que de nuevo bajo las condiciones del ensayo, no se detectó actividad celulásica en *S. meliloti* 1021.

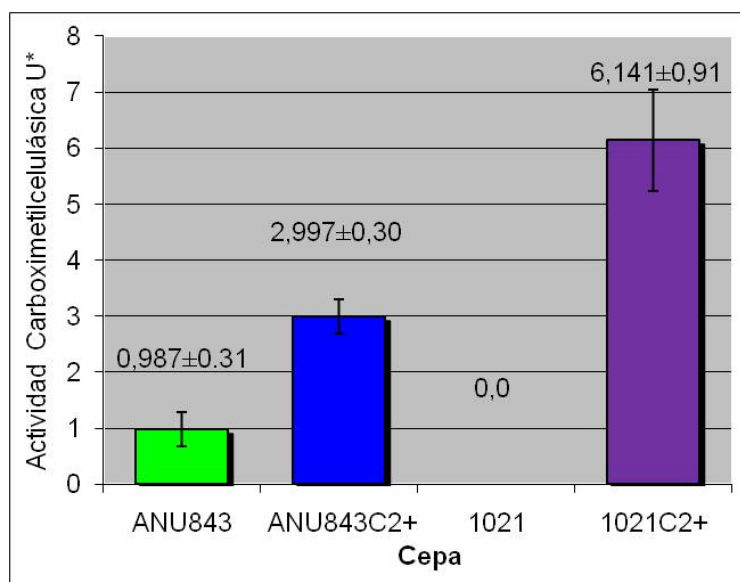


Figura 80. Actividad celulolítica en extractos celulares de las cepas silvestres *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843/ANU843C2⁺ y *S. meliloti* 1021/1021C2⁺. Los datos se muestran en unidades enzimáticas (U) y corresponden a la media de al menos tres determinaciones independientes en las que en cada una se hicieron al menos tres medidas para cada tiempo. Las barras de error representan la desviación estándar entre ellas. * Una unidad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que libera 1 nmol del azúcar reductor equivalente (glucosa) por min a 40 °C y pH 5,0.

Por otro lado, estos resultados nos permiten comprobar que la capacidad de producción de actividad celulolítica en la cepa 1021C2⁺ mediante la transformación con el plásmido pJZC2 que contiene una copia del gen *celC*, da lugar incluso al doble de actividad que la correspondiente a la cepa ANU843C2⁺. Una posible explicación de este hecho es que la cepa 1021 haya integrado un mayor número de copias del plásmido pJZC2 que la cepa ANU843C2⁺, posiblemente debido a que, ya que esta la cepa 1021 es capaz de crecer a bajas concentraciones de km, su selección y posteriores resiembras se llevaron a cabo en medios que contenían mayores concentraciones de este antibiótico para asegurar la estabilidad del plásmido.

2.2. Fenotipo en *Trifolium repens*

Una vez introducido el gen *celC*, que determina la capacidad de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* de infectar trébol, en una cepa de *S. meliloti* que no posee dicho gen, se planteó la posibilidad de que este recombinante pudiera romper la barrera de especificidad y conseguir que esta cepa de *S. meliloti* transformada con el gen *celC* fuera capaz de llevar a cabo la infección primaria de trébol, que no es un hospedador compatible de esta planta. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de infectividad y se compararon los fenotipos de las cepas 1021 y 1021C2⁺ marcadas con GFP en trébol mediante microscopía confocal de las raíces de *T. repens*.

Tanto en la cepa silvestre 1021 como en 1021C2⁺ se pudo apreciar la adhesión de las bacterias a la superficie de la raíz (Figura 81 A, D). Este proceso de adhesión a la planta por parte de los rizobios suele producirse tanto en leguminosas compatibles como incompatibles e incluso en no-leguminosas, aunque suele darse en mayor medida en las primeras (Fujishige *et al.*, 2006b). También se pudo observar cómo la mayoría de las bacterias también se adhieren a los pelos radicales, pero parece que no forman una estructura tipo “cap” en la punta de los pelos de forma tan frecuente como en su rizobio compatible, sino que en ocasiones se adhiere un poco por debajo de esta (Figura 81 B, C, E).

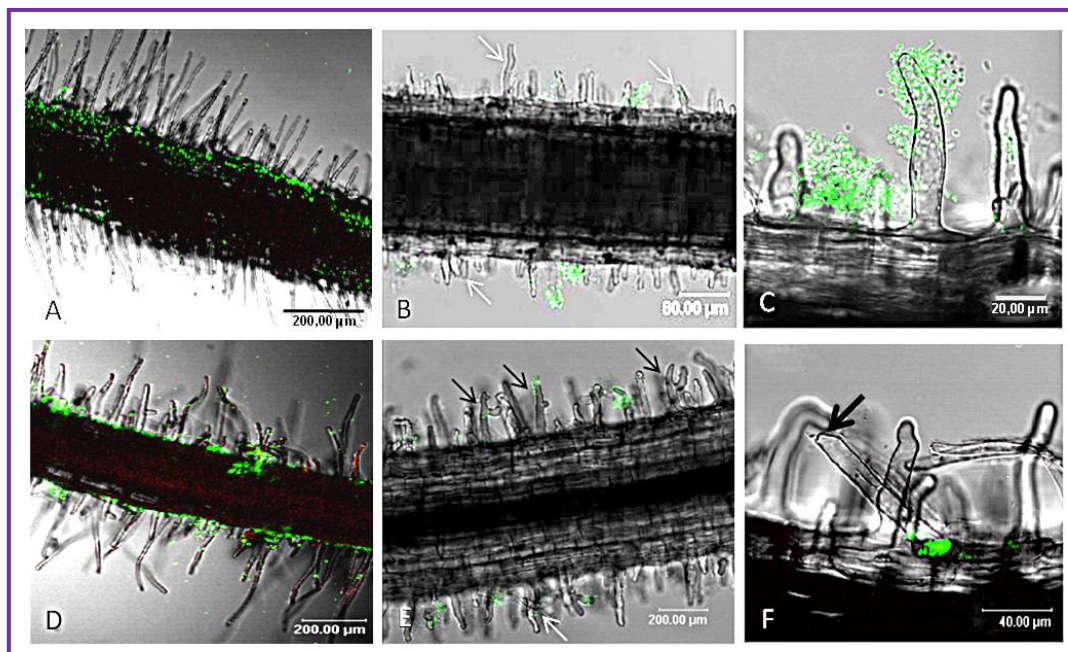


Figura 81. Sucesión de eventos en plantas de trébol a los 7 días de ser inoculadas con la cepa 1021GFP (A-C) y 1021GFPC2⁺ (D-F). Las imágenes fueron tomadas mediante microscopía confocal, y muestran como las cepas de *S. meliloti* son capaces de adherirse a la raíz de trébol (A, D) y a los pelos radicales (B- E), en los que inducen ciertas deformaciones (flechas blancas). En la microfotografía E, se puede observar cómo la cepa superproductora del enzima CelC2 mostró además la capacidad de formar numerosas redirecciones en los pelos radicales (flechas negras). Además, como muestra la imagen F, esta cepa es capaz de inducir la formación de un orificio en la punta del pelo radical (flecha negra), facilitando la entrada de las bacterias en el interior de los pelos radicales pero sin formar canales de infección.

Además, se observan distintas deformaciones “inespecíficas” en los pelos radicales (Figura 81 B, E), como pelos cortos globulosos y serpenteantes que también son comunes cuando las plantas son inoculadas con rizobios incapaces de sintetizar los factores de nodulación que tengan la estructura adecuada para que progrese la simbiosis. Sin embargo, las redirecciones de los pelos radicales son más frecuentes en las plantas inoculadas con la cepa que sobreexpresa la celulasa C2, donde también se observa la formación de orificios en la punta de los pelos radicales (fenotipo Hot). Incluso se observaron pelos radicales cuyo extremo apical había sido hidrolizado y en cuyo interior se encontraban bacterias, llegando incluso hasta la base del pelo radical (Figura 81 F). Se observan zonas donde pelos radicales no han sido alterados y otras con pelos completamente hidrolizados cuyo citoplasma ha sido expulsado al exterior encontrándose vacíos por dentro. Generalmente, los pelos sin alterar no tienen bacterias adheridas o éstas se encuentran unidas a la base del pelo, nunca formando aglomeraciones en la punta.

Por tanto, estos ensayos nos permiten confirmar que la cepa *S. meliloti* 1021 no es capaz de formar estructuras tipo “curling” ni canales de infección en las plantas de trébol, un hospedador no específico, pero sí se adhiere a la raíz y a los pelos radicales y penetra a través de espacios intercelulares (datos no mostrados). Además, las plantas de *Trifolium repens* inoculadas con la cepa 1021C2⁺ muestran una serie de alteraciones en los pelos radicales, ya que esta cepa es capaz de hidrolizar el ápice de estas estructuras e incluso entrar en su interior. Sin embargo, probablemente por la ausencia de los factores de nodulación específicos, esta cepa no forma canales de infección en trébol y la infección no progresa.

2.3. Fenotipo simbiótico en *Medicago sativa*

Paralelamente, se llevaron a cabo estudios del fenotipo simbiótico provocado por la expresión heteróloga del gen *celC* en la cepa 1021 de *Sinorhizobium meliloti* al ser inoculada en alfalfa (*Medicago sativa*) para determinar qué ocurre en las primeras etapas del proceso de infección y en particular en relación con la interacción con los pelos radicales. Al realizar tanto estas pruebas de infección como los ensayos de nodulación y compararlos con los obtenidos con *S. meliloti* 1021, se han encontrado diferencias relevantes tanto en la deformación de los pelos radicales como en el desarrollo de los nódulos.

2.3.1. Ensayos de infectividad

Estos ensayos se llevaron a cabo inoculando plantas de alfalfa (*M. sativa*) en placa con las cepas 1021 y 1021C2⁺, tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos. Las distintas etapas iniciales del proceso de infección

fueron monitorizadas utilizando bacterias marcadas con la proteína fluorescente verde (GFP) mediante microscopía confocal. Los pelos radicales de *Medicago sativa* inoculados tanto con la cepa 1021 como con 1021C2⁺ sufrieron las deformaciones típicas que presentan habitualmente en presencia de los factores de nodulación producidos por un rizobio compatible (fenotipo *Had*) y fueron capaces de inducir la formación de primordios nodulares en las raíces de la planta (fenotipo *Noi*).

Por otro lado, se pudo observar como la cepa silvestre es capaz de adherirse a la punta de los pelos formando el “cap” (Figura 82 A) e inducir en ellos la deformación típica que conduce al desarrollo del cayado de pastor o “curling” completo (fenotipo *Hac*) (Figura 82 B). Este fenotipo también se observa tras la inoculación con la cepa 1021C2⁺, pero además la punta de algunos pelos radicales en crecimiento son claramente degradados dejando un hueco en este lugar, resultando en la extrusión de citoplasma (Figura 82 C). Así, gran cantidad de pelos radicales inoculados con la cepa superproductora 1021C2⁺ presentaron la degradación exagerada del extremo terminal y la entrada en su interior sin que se haya producido el “curling” completo (Figura 82 C, D) resultado de una extensiva degradación de la celulosa no cristalina situada en el ápice.

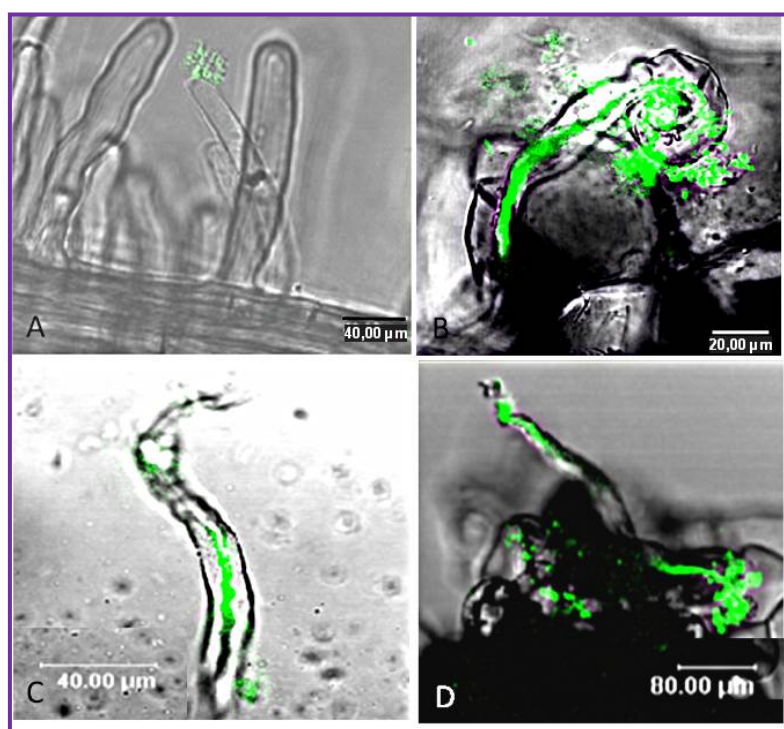


Figura 82. Sucesión de eventos relacionados con la infección primaria de plantas de alfalfa inoculadas con las cepas 1021GFP (A-B) y 1021GFPC2⁺ (C-D). Las imágenes, tomadas mediante microscopía confocal de fluorescencia, muestran la capacidad de la cepa silvestre de *S. meliloti* de adherirse a la punta de los pelos (A) y formar el “curling” o cayado de pastor y el canal de infección (B) en ellos. En las microfotografías C y D, se puede observar cómo el superproductor del enzima CelC2, que también mostró la capacidad de formar estructuras tipo “curling” en los pelos radicales, induce la formación de un orificio de gran tamaño en la punta del pelo radical que provoca la extrusión del citoplasma de la célula y la entrada de las bacterias en el interior de los pelos radicales sin formar previamente el curling (C, D).

Estos resultados no concuerdan con los obtenidos al purificar la celulasa CelC2 y comprobar su efecto sobre las raíces de alfalfa, en los que no se observaba la hidrólisis localizada de la punta del pelo radical (Robledo *et al.*, 2008). Sin embargo, los ensayos de actividad biológica se llevaron a cabo con una pequeña concentración de la celulasa CelC2 y después de 12 h de incubación enzimática, y en el caso de los ensayos de infección el enzima no se encuentra distribuido uniformemente en la solución en la que está inmersa la planta, sino que la cepa 1021C2⁺ está actuando directamente sobre algunos pelos radicales en los que previamente se ha producido la adhesión. Además hay que tener en cuenta que el recombinante produce una gran cantidad de enzima, como se ha comprobado anteriormente (Figura 80) y que, por el contrario, la acción del enzima purificado en presencia de la planta se puede ver disminuida con el tiempo por efecto de la degradación provocada por proteasas producidas por la planta, mientras que en el caso de la cepa 1021C2⁺, el organismo se encuentra continuamente sintetizando el enzima.

2.3.2. Ensayos de nodulación

A continuación, se llevaron a cabo ensayos de nodulación inoculando plantas de *M. sativa* con las cepas 1021 y 1021C2⁺ tanto bajo condiciones monoxénicas en tubo a distintas concentraciones de inóculo en ausencia de nitrógeno, como en cultivo en invernadero para analizar distintos parámetros de la simbiosis durante el ensayo así como la morfología de los nódulos y si el desarrollo de las plantas se ve afectado al inocular con la cepa superproductora de la celulasa CelC2 en alfalfa.

.2.3.2.1 Morfología nodular y cinética de nodulación (*Nod*)

Tal y como se había observado en los ensayos de infección, tanto la cepa 1021 como 1021C2⁺ indujeron la formación de primordios nodulares en las plantas de alfalfa a los pocos días de ser inoculadas. A lo largo de los ensayos de nodulación llevados a cabo *in vitro*, se registró el número de nódulos encontrados indicando si eran efectivos o no (Figura 84). También se tomaron datos de la altura de la parte aérea y radical de cada una de las plantas al final del experimento (Figura 85), aunque las diferencias no se pueden apreciar de forma óptima debido a que esta planta tiene un porte considerable y la altura de los tubos utilizados suponen una limitación a su desarrollo.

La cepa silvestre 1021, indujo la formación de nódulos característicos, piriformes y rosados (Figura 83 A), indicativos de que la fijación de nitrógeno se estaba llevando a cabo en su interior (Figura 83 B). Sin embargo, en las plantas inoculadas con la cepa 1021C2⁺ se observó que aproximadamente el 26% de las estructuras nodulares que estaban aparentemente infectadas (Figura 83 E) no mostraban coloración rosácea en su interior (Figura 83 F). Además, en muchos

casos no eran piriformes sino que mostraban distintas morfologías aberrantes, especialmente en la zona de desarrollo nodular, y una histología externa en ocasiones visiblemente desorganizada e, incluso en algunos casos, una marcada necrosis caracterizada por la coloración parduzca o marrón oscura de los nódulos. Aún así, en la mayoría de las plantas de alfalfa inoculadas con la cepa 1021C2⁺, también aparecían nódulos aparentemente efectivos similares a los que induce la cepa 1021.

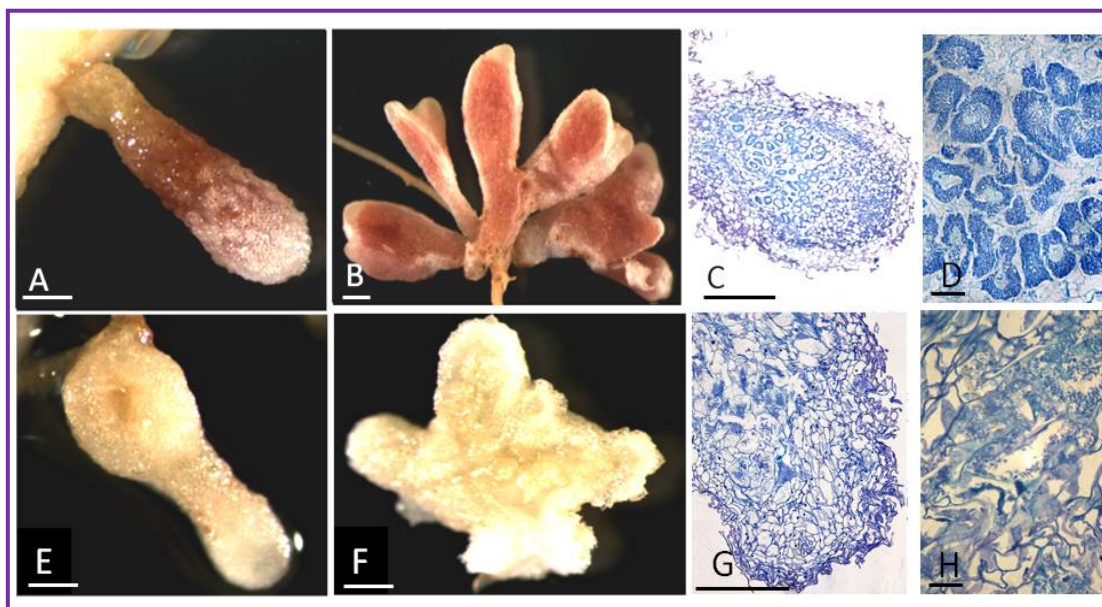


Figura 83. Desarrollo nodular (Nod) de plantas representativas de alfalfa después de ser inoculadas con la cepa 1021 (A-D) y 1021C2⁺ (E-F). Se muestran por un lado zonas de la raíz que presentan nódulos (A, E) y secciones longitudinales de estos *in vivo* (B, F) o teñidos con azul de toluidina (C, D, G, H). Escalas 1 mm (A-C); 500 nm (D-H).

Los cortes histológicos de estos nódulos aberrantes muestran la desorganización de las estructuras celulares internas donde parece que los rizobios se encuentran sino distribuidos al azar y ocupando los espacios intercelulares (Figura 83 G, H). Estas estructuras difieren significativamente de las secciones longitudinales de los nódulos que aparecen en las plantas inoculadas con la cepa silvestre, donde se observan las típicas estructuras y zonas características de un nódulo efectivo (Figura 83 C, D).

El número de nódulos por planta a lo largo del experimento fue ligeramente superior en la cepa silvestre que en el recombinante 1021C2⁺, especialmente a partir de las tres semanas tras la inoculación, momento en el que esta cepa apenas sigue induciendo la formación de nuevos nódulos (Figura 84 A). Así, el número medio de nódulos por planta al final del experimento fue significativamente mayor en las plantas inoculadas con la cepa silvestre con respecto a la cepa 1021C2⁺ según el test LSD protegido de Fisher para $P = 0,05$ (Figura 84 B).

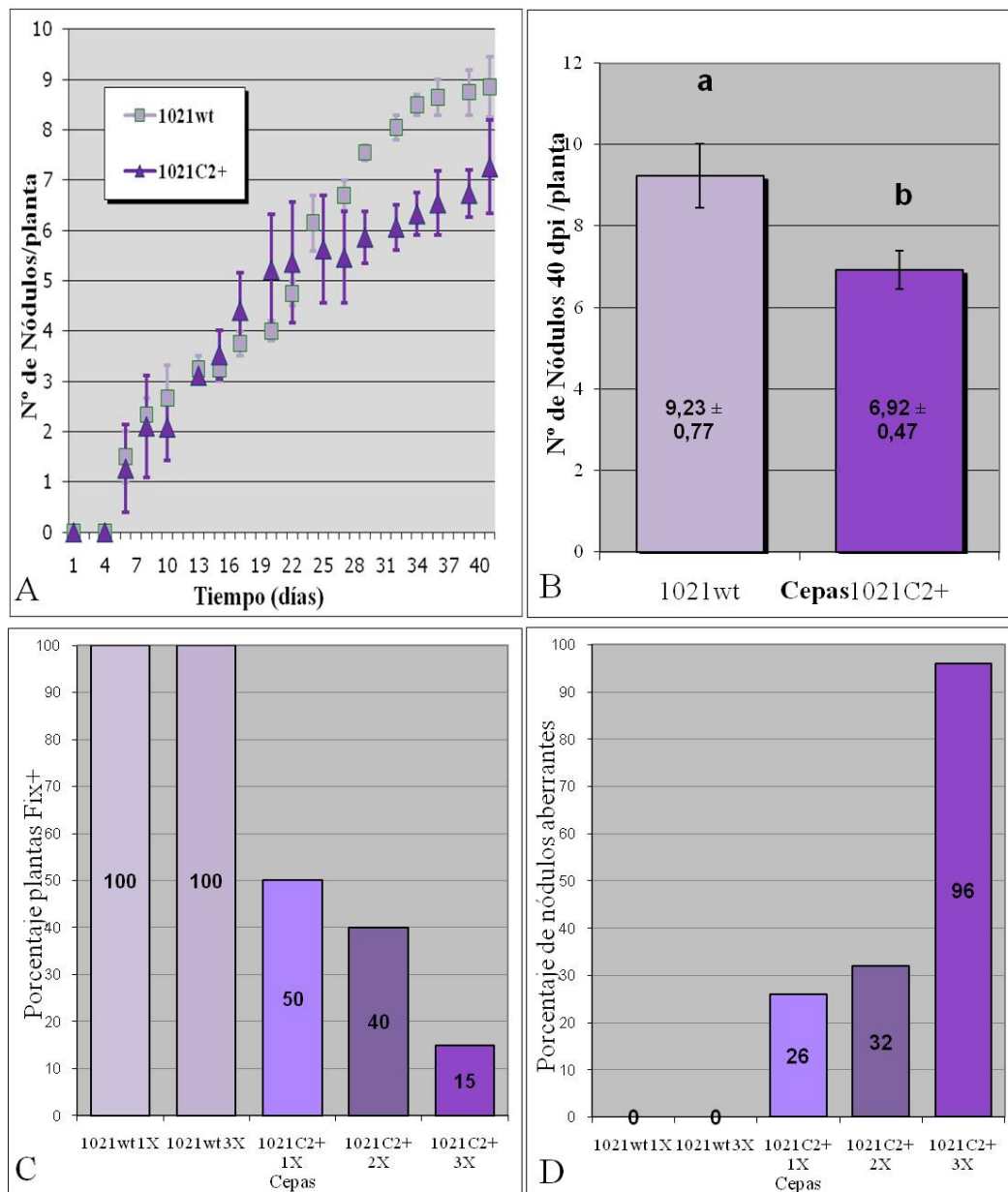


Figura 84. Parámetros de nodulación de plantas de alfalfa inoculadas con las cepas 1021, 1021C2⁺ con distintas cantidades de inóculo: 1 ml a D.O._{600nm}: 0,5 (1X); 1,0 (2X) y 1,5 (3X). A) Cinética de nodulación B) Número de nódulos por planta al final del ensayo C) Porcentaje de plantas Fix⁺ D) Porcentaje de nódulos aberrantes. *Las plantas se cultivaron en ausencia de nitrógeno durante 40 días.* Los valores representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes, cada uno de los cuales se llevó a cabo con al menos 12 plantas.

Por tanto, parece que de nuevo una mayor producción de la celulasa CelC2 podría estar relacionada con una menor capacidad de inducir nódulos incluso en alfalfa. Para conocer las posibles causas de este fenotipo, a continuación se estudiará si el proceso de señalización entre ambos simbioses se ve afectado mediante el análisis de parámetros relacionados con el proceso de señalización *Rhizobium*-leguminosa, utilizando *Medicago truncatula* como planta de estudio

ya que en *M. sativa* no se encuentran disponibles las construcciones necesarias para llevar a cabo estos ensayos.

Por otro lado, aproximadamente un 50% de las plantas inoculadas con la cepa superproductora de la celulasa CelC2, además de presentar una disminución en el número de nódulos, parecían mostrar deficiencias en la fijación nitrógeno (Figura 84 C). Para estudiar si estos efectos eran acumulativos, se decidió llevar a cabo los ensayos con distintas concentraciones de inóculo: 1 ml a D.O._{600nm}:0,5 (1X), 1,0 (2X) y 1,5 (3X), comprobando que las plantas inoculadas con la cepa silvestre en estas condiciones no presentan diferencias en la nodulación (Figura 84 C, D). Así, el análisis del fenotipo simbiótico concluyó con la observación de un incremento en las diferencias observadas tanto en el proceso de nodulación como en el desarrollo vegetal entre la cepa silvestre y la cepa recombinante 1021C2⁺ a medida que aumentaban las concentraciones de inóculo (Figura 84 C, D).

La determinación del porcentaje de plantas aparentemente capaces de fijar nitrógeno (Fix⁺), resultó ser del 100% en las plantas inoculadas con la cepa 1021 tanto a 1X como a 3X. Sin embargo, este parámetro se redujo de 50% (1X) a 40% (2X) y finalmente, al añadir un inóculo de la cepa 1021C2⁺ un tamaño tres veces mayor, apenas se observaron plantas con un fenotipo Fix⁺ (15%) (Figura 84 C), curiosamente un porcentaje bastante similar al observado en plantas de trébol inoculadas con la cepa ANU843C2⁺ (Figura 68). Paralelamente, el porcentaje de nódulos con morfologías aberrantes aumentó a medida que el tamaño del inóculo fue mayor, desde un 26% (1X) a 32% (2X) y finalmente, al añadir un inóculo de un tamaño tres veces mayor, la mayor parte de los nódulos presentaban una apariencia aberrante (96%) mientras que las plantas inoculadas con la cepa silvestre no presentan este fenotipo (Figura 84 D).

Por tanto, parecen existir diferencias bastante notables en la histología nodular así como en el número de nódulos totales y aberrantes en las plantas inoculadas con las cepas 1021 y 1021C2⁺, que se incrementan a medida que aumenta la concentración de inóculo. Esto nos permite confirmar que la sobreexpresión del gen *celC* puede afectar significativamente a la capacidad infectiva de *S. meliloti* 1021, alterando la organogénesis normal de los nódulos que se encuentran invadidos intra e intercelularmente por bacterias superproductoras de la celulasa CelC2 sin formar bacteroides. Probablemente este efecto sea debido de nuevo por una liberación incontrolada de las células del canal de infección sin rodearse de membrana peribacteroidea, como se observó en la simbiosis *Trifolium repens*- *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843C2⁺.

.2.3.2.2 Desarrollo de las plantas y fijación de nitrógeno (Fix)

Como ya se ha señalado anteriormente, en los ensayos monoxénicos de nodulación no se puede cuantificar de forma óptima las diferencias en crecimiento entre las plantas ni el potencial fijador de nitrógeno real de alfalfa ya que el

cultivo hidropónico en tubo supone un límite al crecimiento de las plantas. No obstante, se pudo apreciar que las plantas de alfalfa inoculadas con la cepa *S. meliloti* 1021 se desarrollan con normalidad en el medio sin nitrógeno mientras que algunas plantas que fueron inoculadas con la cepa *S. meliloti* 1021C2⁺ presentaron un desarrollo inferior y una coloración más amarillenta que denota que se ve comprometida la capacidad de fijar nitrógeno, especialmente a medida que el tamaño de inóculo se incrementa (Figura 84 y figura 85).

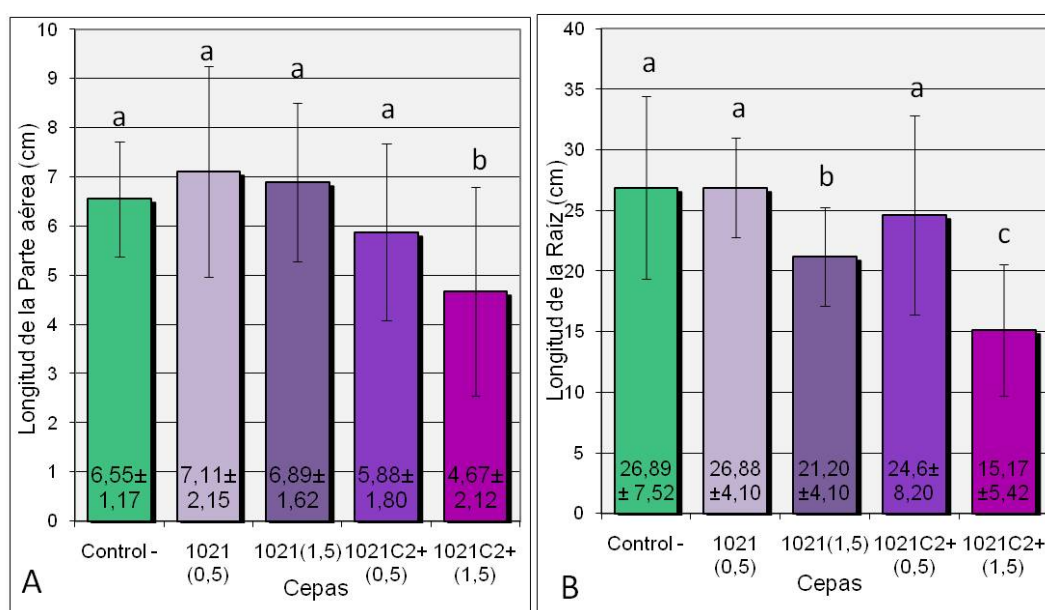


Figura 85. Fenotipo simbiótico de plantas de alfalfa sin inocular (Control-) y después de ser inoculadas con la cepa 1021 o 1021C2⁺ a distintas concentraciones de inóculo (DO_{600nm}: 0,5 y 1,5). A) Longitud de la parte aérea y (B) de la raíz. Las plantas se cultivaron en tubos en ausencia de nitrógeno durante 40 días. Para cada parámetro, los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente según el test LSD protegido de Fisher para P = 0,01. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los valores respecto a la media.

Para cuantificar estas diferencias, se tomaron medidas de la longitud de la parte aérea y de la raíz de las plantas de tres experimentos independientes y se analizaron los datos obtenidos mediante el test de Fisher. Cabe destacar que en este caso sí se encontraron diferencias en la longitud de la parte aérea de las plantas inoculadas con la cepa silvestre a distintas D.O._{600nm}, aunque no eran significativas. Únicamente los resultados difieren con significancia estadística entre la longitud de la parte aérea de las plantas inoculadas con las cepas 1021 y 1021C2⁺ cuando ambos son inoculados a una D.O._{600nm}: 1,5 (3X) (Figura 85 A). Por otro lado, la longitud de la raíz de las plantas inoculadas con las distintas cepas de estudio también difirió significativamente entre ellas a partir de D.O._{600nm}: 1,5 (3X) (Figura 85 B).

Estos resultados sugieren que la simbiosis entre la cepa 1021C2⁺ y *Medicago sativa* es menos efectiva en la fijación de nitrógeno. Sin embargo, para evaluar mejor si existen diferencias en el desarrollo de las plantas inoculadas con las distintas cepas de estudio en ausencia de nitrógeno, se llevaron a cabo ensayos

en invernadero y se tomaron datos de longitud de la parte aérea y radicular, peso seco y contenido en nitrógeno de plantas inoculadas con las cepas 1021 y 1021C2⁺ (Figura 86). Así, se pudo observar que las plantas inoculadas con la cepa 1021C2⁺ presentaron un desarrollo inferior al de las plantas inoculadas con la cepa 1021, unido a una coloración menos verdosa de sus hojas provocada por la falta de nitrógeno en el medio y su mermada capacidad de fijarlo (Figura 86).



Figura 86. Fenotipo final de plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) representativas inoculadas con las cepas 1021 y 1021C2⁺ y sin inocular (Control -) cultivadas en invernadero en ausencia de nitrógeno durante 90 días.

Los datos obtenidos muestran que los valores relativos al crecimiento de las plantas inoculadas con la cepa recombinante fueron significativamente inferiores a las inoculadas con la cepa silvestre con un nivel de confianza del 99%, lo que nos permite confirmar la notable deficiencia en la capacidad fijadora de nitrógeno que presenta la cepa 1021C2⁺ (Figura 87).

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el desarrollo radicular de las plantas inoculadas con las cepas 1021 y 1021C2⁺ en estas condiciones, pero de nuevo el ensayo en invernadero permite apreciar mucho mejor las diferencias en crecimiento que el ensayo en tubos. Así, podemos concluir que el enzima CelC2 actúa de manera similar tanto en el sistema simbiótico *Rhizobium-Trifolium* como en *Sinorhizobium-Medicago*, es decir, es capaz de degradar la punta de algunos pelos radicales y posiblemente el final del canal de infección en las plantas de alfalfa, manteniendo inalteradas el resto de estructuras. Esto ocasiona la aparición de un mayor número de nódulos aberrantes inefectivos en las plantas de alfalfa inoculadas con *S. meliloti* 1021C2⁺ que

presentan un desarrollo significativamente inferior (síntoma de una menor efectividad) al de las plantas inoculadas con la cepa silvestre *S. meliloti* 1021.

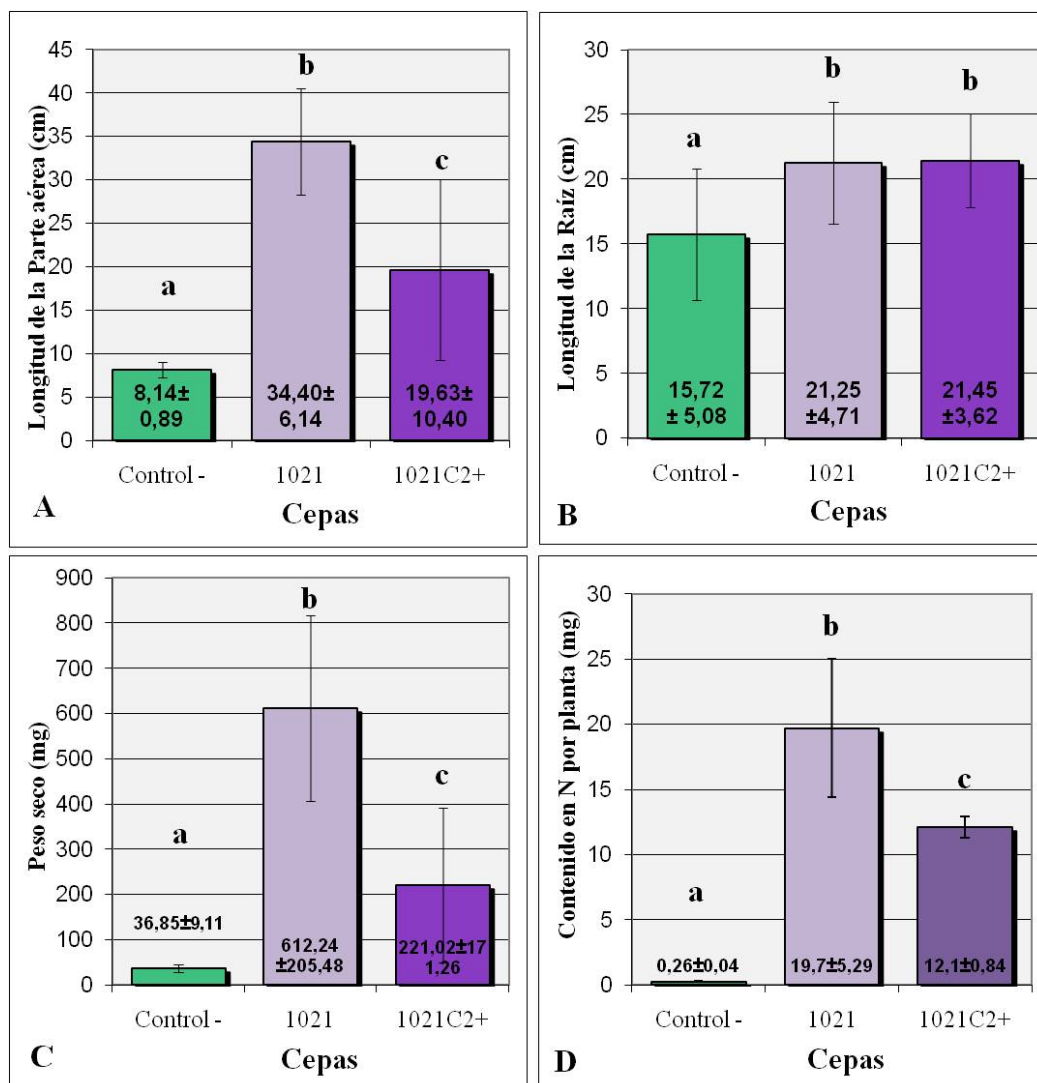


Figura 87. Eficiencia fijadora de las cepas de estudio determinada mediante la longitud de la parte aérea (A), de la raíz (B), peso seco (C) y contenido en nitrógeno (D) de las plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) sin inocular (Control-) e inoculadas con las cepas 1021 y 1021C2⁺ cultivadas en invernadero en ausencia de nitrógeno durante 90 días. Los datos que se presentan son los valores medios representativos de tres experimentos independientes y su correspondiente desviación estándar. Cada uno de los experimentos se llevó a cabo con al menos 24 plantas. Para cada parámetro, los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente según el test LSD protegido de Fisher para P = 0,01.

3. EFECTO DE LA CELULASA CelC2 EN LA PERCEPCIÓN DE LOS FACTORES DE NODULACIÓN POR PARTE DE LA PLANTA

Tras analizar el fenotipo simbiótico de la cepa 1021C2⁺ en alfalfa y comprobar que gran cantidad de pelos radicales presentaron una degradación exagerada del extremo terminal y además que el número medio de nódulos por planta al final del experimento fue significativamente menor que en las plantas inoculadas con la cepa silvestre, el siguiente objetivo era comprobar si esta mayor producción de la celulasa CelC2 podría estar interfiriendo en el proceso de señalización entre ambos simbioses.

Para comprobar si el diálogo molecular *Rhizobium*-leguminosa se ve afectado por la celulasa CelC2, se llevaron a cabo el análisis de parámetros relacionados con este proceso utilizando *Medicago truncatula* como planta de estudio, donde se encuentran disponibles las plantas transformadas con las construcciones necesarias para realizar ensayos como la determinación del patrón de los pulsos de calcio y el análisis de la expresión de los genes de nodulación temprana.

3.1. Fenotipo simbiótico de *Medicago truncatula* inoculada con *S. meliloti* 1021C2⁺

En primer lugar, se comprobó si el fenotipo simbiótico observado en *M. sativa* se reproduce en *M. truncatula* para poder interpretar mejor los posibles resultados obtenidos en los ensayos subsiguientes. Este estudio puede resultar interesante además debido a que las plantas de *M. truncatula* son infectadas de forma menos eficiente por parte de la especie *Sinorhizobium meliloti* que por *S. medicae*, y dentro de esta segunda especie, la cepa WSM419 sí presenta homólogos al gen *celC* en su genoma. Por tanto, las cepas *S. meliloti* 1021 y 1021C2⁺, fueron inoculadas en plantas de *M. truncatula* para llevar a cabo ensayos de infección y de nodulación.

La caracterización simbiótica de *Sinorhizobium meliloti* 1021C2⁺ en los ecotipos A17 y R108 de *Medicago truncatula*, reveló que a nivel de infección primaria a los 3 días después de la inoculación, se producen deformaciones aberrantes y en ocasiones incluso una degradación exagerada del ápice de los pelos radicales incluso sin que se haya producido el “curling”, a diferencia de lo que ocurre durante la infección en la cepa silvestre *S. meliloti* 1021 (Figura 88 A), donde se observan las deformaciones típicas originadas por los NF. De nuevo se observó cómo algunos pelos radicales hidrolizados por la cepa 1021C2⁺ fueron capaces de continuar su crecimiento formando redirecciones polares, e incluso algunos fueron capaces de desarrollar *curling* y formar canales de infección (datos

no mostrados). Sin embargo, casi todas las raíces mostraron una gran proporción de pelos decapitados (Figura 88 B, C).

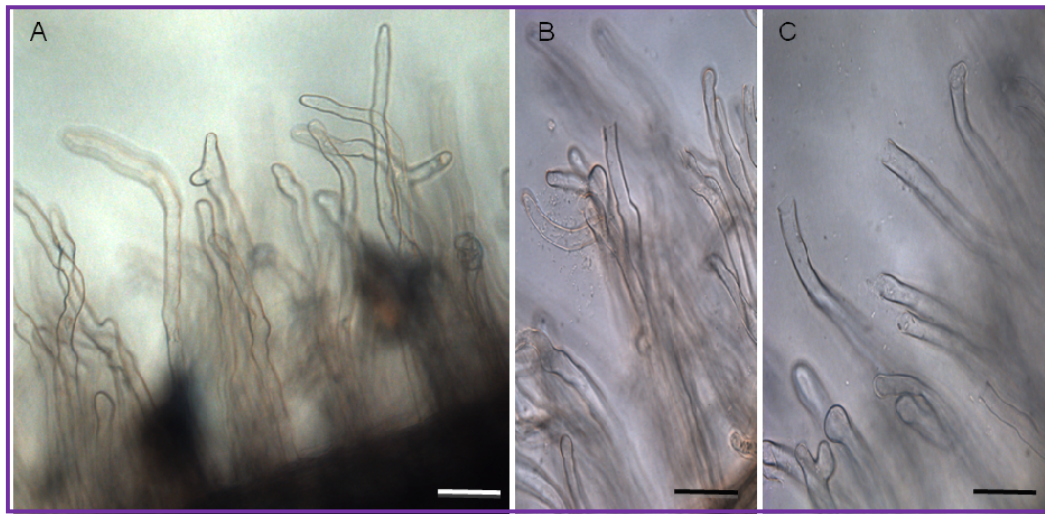


Figura 88: Microscopía óptica de los eventos relacionados con la infección primaria en *M. truncatula* a los tres días de ser inoculada con *S. meliloti* 1021 (A) y 1021C2⁺ (B, C) donde se observan pelos radicales degradados y decapitados. Escalas (A) 70 μ m, (B) y (C) 16 μ m.

También se llevaron a cabo ensayos de nodulación *in vitro* en placas cuadradas de 20 x 20 cm con medio sólido Fåhreaus sin nitrógeno. Transcurridas tres semanas tras la inoculación se observaron algunos nódulos característicos en plantas inoculadas con *S. meliloti* 1021, aunque no todos eran efectivos (Figura 89 A). Sin embargo, en las plantas inoculadas con la cepa *S. meliloti* 1021C2⁺ apareció un mayor número de nódulos aberrantes que presentaban una morfología más redondeada y una aparente senescencia prematura baja efectividad en la fijación de nitrógeno (Figura 89B). También se observó que la cepa 1021C2⁺ muestra un retardo en la cinética de nodulación y en el número de nódulos totales detectados con respecto a la cepa silvestre (Figura 89 C), que puede también explicar el menor crecimiento de la parte aérea de las plantas (Figura 89 D).

Por último, los ensayos preliminares de invernadero muestran también un menor desarrollo en las plantas inoculadas con la cepa 1021C2⁺ y un aspecto ligeramente más clorótico de sus hojas en ausencia de nitrógeno (Figura 89 E). Sin embargo, también hemos observado que la simbiosis entre *S. meliloti* 1021 y *M. truncatula* no se resulta tan efectiva en la fijación de nitrógeno ya que pese a que se desarrollan un gran número de nódulos, éstos no suelen aparecer ser claramente efectivos y las plantas no se desarrollan completamente.

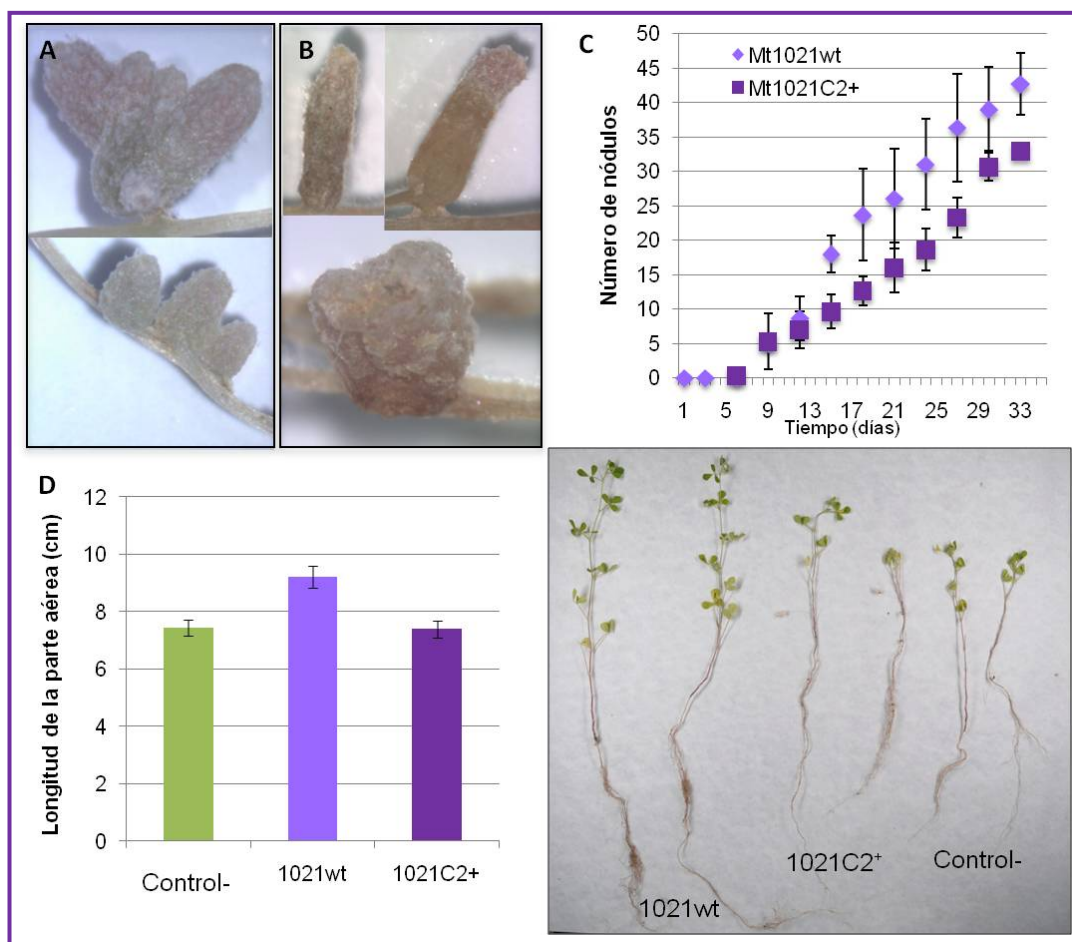


Figura 89. Fenotipo simbiótico de plantas de *M. truncatula* inoculadas con la cepa *S. meliloti* 1021wt y 1021C2⁺ en ensayos *in vitro* (A-D) y en invernadero (E). (A) Desarrollo nodular de las plantas 33 días después de la inoculación con 1021wt y (B) 1021C2⁺. Todas las muestras fueron recolectadas en el mismo experimento. (C) Cinética de nodulación. Se muestran los resultados de tres repeticiones biológicas. Las barras de error muestran el error estándar. (D) Longitud aérea de las plantas al finalizar en ensayo *in vitro*. (E) Fenotipo final de plantas inoculadas con 1021wt (izquierda) y 1021C2⁺ (centro) y sin inocular (derecha) tras 90 días de crecimiento en el ensayo de invernadero.

De este modo podemos concluir que las plantas inoculadas con la cepa 1021C2⁺ presentaron un menor desarrollo aéreo y radicular respecto a la cepa silvestre y en ellas aparecen nódulos aberrantes. Los datos obtenidos recientemente en el laboratorio parecen corroborar que es debido a que las bacterias superproductoras de la celulasa CelC2 también invaden las células del nódulo de forma incontrolada, rompiendo el balance del proceso simbiótico y dando lugar a la formación de nódulos infecciosos pero en algunos casos infecciosos. Por tanto, la producción excesiva de la celulasa CelC2 en la simbiosis *M. truncatula* - *S. meliloti* 1021C2⁺ afecta negativamente al proceso de infección y a la nodulación, mostrando un fenotipo similar al observado en *M. sativa*.

3.2. Influencia de la celulasa CelC2 en los pulsos de Ca^{2+} producidos en los pelos radicales de *M. truncatula*

Los factores de nodulación (NF) purificados son capaces de inducir varias respuestas en los pelos radicales susceptibles de ser deformados, tales como oscilaciones rítmicas de Ca^{2+} denominados “pulsos de calcio” o “*calcium spiking*” (Oldroyd y Downie, 2008), que están implicadas en la transducción de señales que conducen a la inducción transcripcional de varios genes denominados conjuntamente nodulinas tempranas (ENODs). El “*spiking*” de Ca^{2+} es una característica común que se produce durante el desarrollo de la simbiosis nodular en un gran número de leguminosas y puede ser inducida incluso a concentraciones muy bajas de los NF (10^{-11} – 10^{-12} M) (Shaw y Long, 2003).

Aunque aún no se conoce exactamente cuáles son los mecanismos de inducción de los pulsos de Ca^{2+} , varios estudios previos sugieren que los NF probablemente provoquen estos flujos mediante la apertura transitoria de los canales de Ca^{2+} existentes en la membrana nuclear que provocaría un rápido incremento en la concentración de este catión en el citoplasma, seguido de una fase de bombeo de Ca^{2+} de nuevo hacia las zonas que actúan como reservorios de este ión en la planta. La señalización mediada por los pulsos de Ca^{2+} se relaciona con la inducción de los genes tempranos de la nodulación a través de una quinasa calmodulina dependiente de calcio (CCaMK), que parece ser la encargada de integrar los cambios secuenciales en los niveles de Ca^{2+} (Levy *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2004a).

Para determinar si la deficiencia en la nodulación que se observa en las plantas inoculadas con el recombinante 1021C2⁺ es el resultado de la disminución de la sensibilidad a los NF, se evaluó el efecto de la adición de la celulasa CelC2 purificada en el patrón de los pulsos de Ca^{2+} , previamente inducidos por los NF en los pelos radicales de *M. truncatula*. Para ello, se llevaron a cabo la medida de los pulsos de calcio (*calcium spiking*) utilizando una línea de plantas del ecotipo *Medicago truncatula* R108 transformadas que expresan la construcción YC 2.1 *cameleon calcium reporter* bajo el promotor del 35S (Miwa *et al.*, 2006a). Esta construcción es capaz de hacer una estimación de la cantidad de Ca^{2+} intracelular ya que este catión se une a la proteína informadora codificada por la construcción YC 2.1, causando un cambio en la conformación de esta proteína fluorescente quimérica de forma que aumenta la eficiencia del FRET (fluorescence resonance energy transfer) desde la proteína fluorescente de color cian (CFP) hacia la proteína fluorescente amarilla (YFP). De esta forma, al aumentar la concentración de iones Ca^{2+} , la fluorescencia emitida por la CFP disminuye y la fluorescencia correspondiente a la YFP aumenta, pudiendo hacerse una estimación del ratio YCP: CFP que puede ser visualizado (Figura 90 B) y cuantificado mediante el uso del microscopio acoplado a un equipo de fluorescencia, tal y como se detalla en la sección de materiales y métodos.

Así, a los tres días de su germinación, las plantas fueron inoculadas con NF específicos y, gracias a que portaban esta construcción, se pudo cuantificar de

forma relativa las variaciones en la concentración de iones de calcio en el interior de los pelos radicales en función del tiempo mediante el cálculo del ratio de fluorescencia YCP: CFP dando una medida relativa del FRET. En primer lugar, se comprobó que los NF producen una respuesta por parte de la planta consistente en el aumento periódico y posterior disminución de la cantidad de calcio en el citoplasma que se puede observar en los trazos obtenidos, donde cada aumento o pulso de calcio se ve representado por un pico (Figura 90 A).

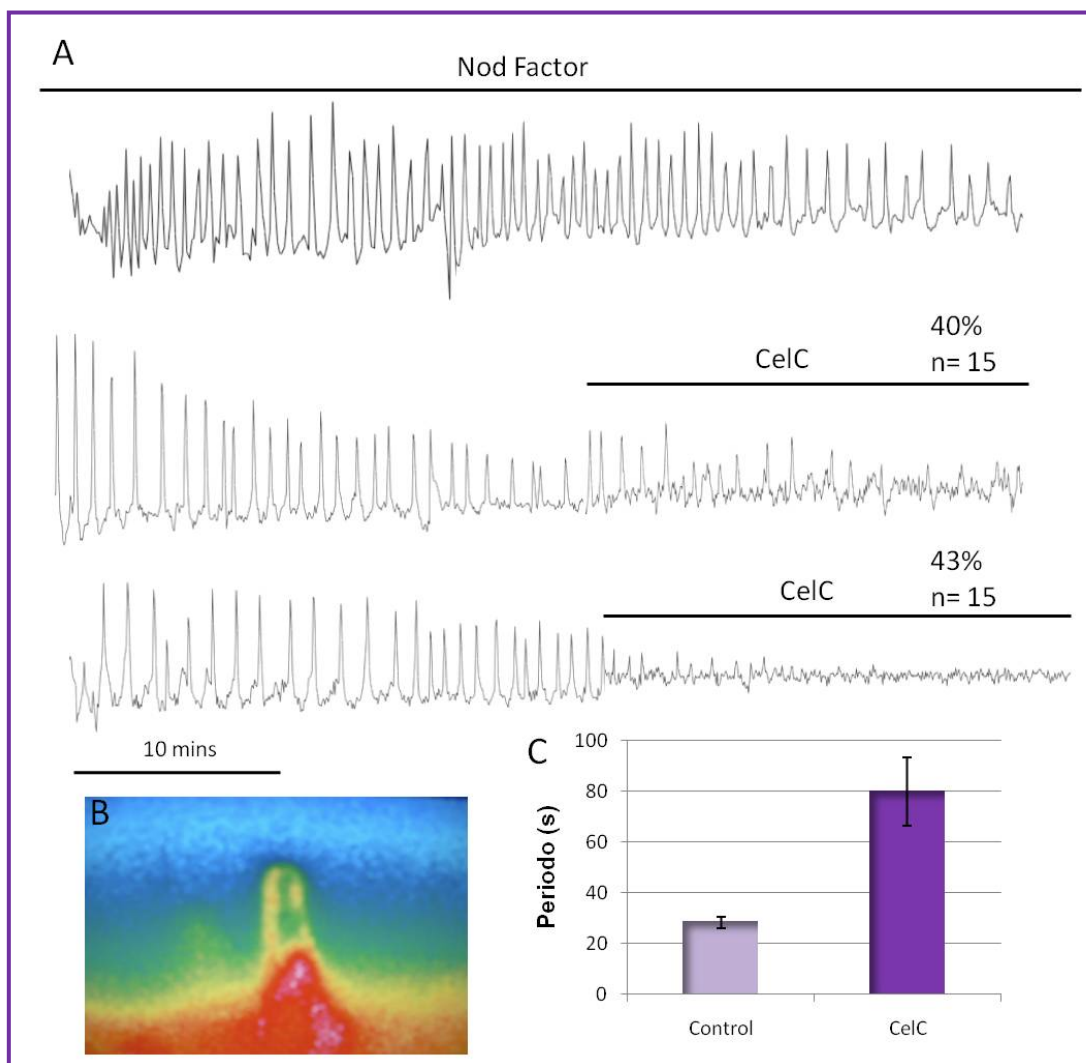


Figura 90. Spiking de calcio inducido por los Factores de Nodulación y efecto que produce la adición de la celulasa CelC2 en *M. truncatula* YC 2.1. (A) Trazas representativas del flujo de calcio en las células de los pelos radicales de *M. truncatula* preinducidas con 1 nM de NF y tratadas en el segundo y tercer trazo con 5µg/µl de la celulasa CelC2 (1U) purificada aproximadamente media hora después. El eje y representa el ratio CFP: YFP en unidades arbitrarias y el eje de abscisas corresponde al tiempo. La primera traza de referencia (arriba) muestra la capacidad de los NF de inducir los pulsos de Ca^{2+} en los pelos radicales. El tratamiento con CelC2 provoca irregularidades en el intervalo entre los pulsos de calcio o los inhibe. En la parte derecha de cada traza se muestra el porcentaje de células visualizadas que siguen el comportamiento mostrado y el tamaño de la muestra analizada. (B) Imagen de un pelo radical de *M. truncatula* tomada con el programa utilizado en estos ensayos. (C) Efecto del tratamiento con 5µg/µl de la celulasa CelC2 en el período entre los picos de Ca^{2+} . Para analizar la periodicidad entre los picos, se midió el tiempo entre dos máximos y se calculó el promedio. Las barras indican el error estándar.

Después de transcurrir unos 30 minutos tras del comienzo de la visualización de los primeros pulsos de calcio, se retiró el medio de cultivo y rápidamente se repuso con medio fresco conteniendo de nuevo los NF en la plantas control o, en algunas plantas, además la celulasa CelC2 purificada a una concentración final de 5 pg/μl (1U) para comprobar la respuesta de los pelos radicales de la planta. Los pelos en los que se añadió de nuevo únicamente NF continuaron mostrando el mismo patrón (Figura 90 A, primer trazo).

Sin embargo, la cuantificación de la distribución de la señal de los pulsos de Ca^{2+} obtenida al analizar los pelos radicales tras añadir el NF en combinación con la celulasa CelC2 purificada mostró que ésta fue totalmente abolida en el 43% de los pelos analizados (Figura 90 A, segundo trazo), mientras que en un 40% de los casos, la forma de los picos de Ca^{2+} se vio severamente afectada, observando un aumento del periodo entre ellos, aunque no su total inhibición (Figura 90 A, tercer trazo); mientras que sólo el 17% de los pelos radicales siguen mostrando un comportamiento normal después del tratamiento con la celulasa CelC2. Analizando el periodo entre los picos de Ca^{2+} en aquellos trazos tratados únicamente con los NF o con éstos y la celulasa CelC2 se observa como la periodicidad aumenta significativamente en las muestras inoculadas con la celulasa CelC2 en presencia de los NF (Figura 90 C).

Los resultados obtenidos muestran como la planta responde a la adición de la celulasa de forma que los pulsos de calcio poco a poco van disminuyendo hasta que se hacen prácticamente imperceptibles en la mayoría de los pelos radicales. Sin embargo, aún se desconoce si este efecto inhibitorio es debido a un efecto directo o indirecto, es decir, que se está afectando a la integridad de los pelos por el comienzo de la degradación de la pared celular vegetal o, por el contrario, debido a que se bloquea la señal del Ca^{2+} “*spiking*” provocada por los NF debido a un posible implicación en el diálogo molecular entre la planta y la bacteria, bien de forma directa o a través de la activación de otra ruta de señalización.

Cabe señalar que durante el ensayo en ninguno de los pelos se observó la producción de un orificio en su extremo durante el tiempo de tratamiento con el enzima purificado, coincidiendo con los ensayos previos en los que las primeras señales de degradación se detectaron tras 3 horas postinoculación cuando se hicieron los ensayos biológicos con la enzima purificada en trébol (Robledo *et al.*, 2008). Considerando la importancia de la señalización mediada por los NF en la infección por parte de las bacterias y en la iniciación del nódulo, la inhibición o retardo de la frecuencia de los pulsos de Ca^{2+} por la celulasa CelC2 puede provocar la disminución del número de células que responden a la señalización mediada por los NF, lo cual podría explicar el retardo en la nodulación observado en las plantas inoculadas con las bacterias que sobreexpresan la celulasa CelC2.

3.3. Evaluación de la expresión de los genes de nodulación temprana de la planta

Tras la respuesta inducida por los factores de nodulación, se produce la transducción de la señal emitida por los pulsos de calcio a través de la quinasa CCaMK que resulta en la activación de dos proteínas intermediarias, denominadas NSP1 y NSP2 que forman un complejo necesario para la inducción de ENOD11 (Gleason *et al.*, 2006; Hirsch *et al.*, 2009; Kalo *et al.*, 2005). En este trabajo, para determinar los efectos de la celulasa CelC2 en la inducción de la expresión de estos genes, se utilizaron plantas de la línea 416K de *M. truncatula*, transformadas de forma estable con una fusión transcripcional pENOD11::GUS y que por tanto expresan la enzima β -glucuronidasa (GUS) regulada bajo el control del promotor ENOD11 (Journet *et al.*, 2001).

Estas plantas fueron sometidas a dos tratamientos distintos: por un lado fueron tratadas bien con NF o una mezcla NF+ CelC2 (Figura 91) y por otro lado, también fueron inoculadas con las cepas *Sinorhizobium meliloti* 1021 silvestre o con la cepa recombinante 1021C2⁺ (Figura 92). Transcurridos distintos tiempos post-inoculación, se procesaron las muestras para su revelado. Por un lado, algunas raíces se sometieron a tinción mediante una solución tamponada que contenía X-Gluc para evaluar cualitativamente la actividad β -glucuronidasa a lo largo de la raíz (Ding *et al.*, 2008). Por otro lado, con el objetivo de evaluar cuantitativamente los niveles de expresión *in planta*, se procedió a la obtención de extractos proteicos de las raíces de L416K para llevar a cabo la medida de la concentración de β -glucuronidasa mediante un ensayo fluorimétrico (Jefferson *et al.*, 1987).

Los resultados obtenidos por ambos métodos muestran que el tratamiento conjunto con 5pg/ μ l del enzima CelC2purificado (1U) prácticamente suprimió la inducción mediada por los Factores Nod de ENOD11 a las 6 hpi (Figura 91). Así, tras la tinción con GUS no se observó ninguna respuesta en las plantas tratadas con agua, por lo que toda la raíz permanece sin teñir. Sin embargo, existe una respuesta típica tras la percepción de los NF por la activación de las nodulinas tempranas en las células epidérmicas situadas dentro de una región específica de la raíz alrededor de 0,6 cm del final en las plantas tratadas con los NF purificados, que se ve significativamente reducida en las plantas inoculadas con la misma cantidad de NF en presencia de 1U CelC, presentando una menor coloración azul (Figura 91 A).

Los datos del ensayo colorimétrico concuerdan con los obtenidos en el ensayo fluorimétrico. En ellos se observa una reducción del 65% en la actividad β -glucuronidasa en aquellas plantas inoculadas con la mezcla NF + CelC con respecto a las inoculadas con los factores de nodulación en ausencia de la celulasa

(Figura 91 B). Por tanto, parece que la inducción del promotor ENOD11 *in vitro* se ve bastante reprimida en presencia del enzima CelC2 purificado.

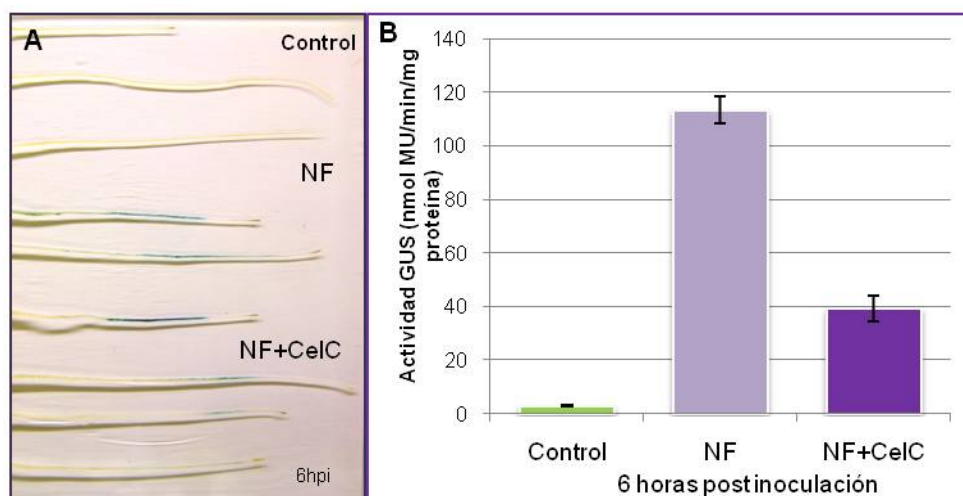


Figura 91. Actividad GUS en las raíces de plantas transformadas con la fusión transcripcional entre el promotor MtENOD11 y el gen GUS a las 6 horas tras el tratamiento con agua (control), 1 pm de Factores Nod (NF) en solitario o junto con 1U del enzima CelC (NF+ CelC). (A) Localización histoquímica de la inducción GUS por los NF y (B) Actividad β-glucuronidasa en las raíces sometidas a los distintos tratamientos. Los experimentos se repitieron tres veces (n = 18) con resultados similares. Las barras muestran el error estándar.

En los ensayos colorimétricos llevados a cabo tras la inoculación con las bacterias de *S. meliloti*, se observó que éstas activan en las células epidérmicas la expresión de ENOD11 dentro de la misma región de la raíz en la que se localiza la inducción mediada por NF, lo confirma que las cepas utilizadas en este estudio están produciendo NF compatibles (Figura 92). Por otro lado, las plantas inoculadas con la cepa *S. meliloti* 1021 mostraron niveles ligeramente superiores de inducción de GUS que la cepa superproductora de la celulasa CelC2, especialmente a las 24 hpi (Figura 92 A) aunque prácticamente se igualan a las 48 horas (Figura 92 B).

Por otro lado, la inoculación con la cepa 1021C⁺ también modifica el patrón de inducción ENOD11-GUS según los ensayos fluorimétricos, produciendo una disminución de la actividad en varios puntos, especialmente después del tratamiento a las 24 y 36 h (Figura 92 C). No obstante, cabe destacar que en algunos puntos los niveles de expresión son similares e incluso se sitúan ligeramente por encima de los obtenidos con la cepa 1021wt. Por tanto, parece que existen unos niveles ligeramente superiores de tendencia después de la inducción de ENOD11 en la cepa silvestre, pero tienden a igualarse con el tiempo.

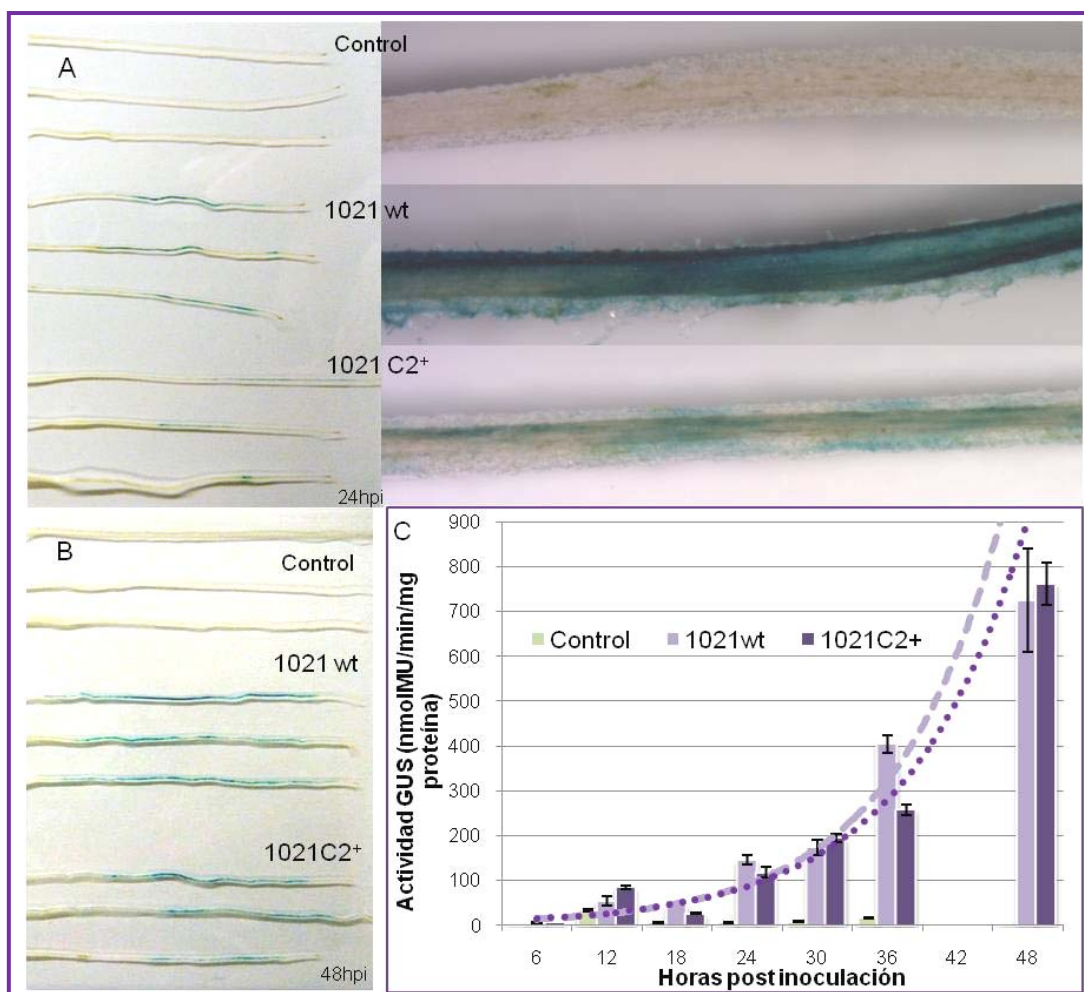


Figura 92. Actividad GUS en las raíces de plantas transformadas con la fusión transcripcional entre el promotor MtENOD11 y el gen GUS a distintos tiempos tras el tratamiento con agua (control) o con 100 μ l de una suspensión de *S. meliloti* 1021 o *S. meliloti* 1021C2⁺ (DO₆₀₀ 0,5). (A) Plantas representativas que muestran la localización histoquímica de la inducción GUS a las 24 hpi. A la derecha se muestra un detalle de una de las raíces tomado con la lupa estereoscópica. (B) Actividad GUS in planta a las 48 hpi. (C) Cuantificación de la actividad β -glucuronidasa medida en la raíces de plantas a las 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 y 48 horas post inoculación. Los experimentos se repitieron tres veces (n = 18) con resultados similares. Las barras muestran el error estándar.

Los resultados obtenidos por ambos métodos son consecuentes y muestran una diferencia de la expresión de estos genes tempranos a determinados tiempos post-inoculación entre el tratamiento control y las condiciones en las que la celulasa se encuentra en el medio en exceso (1021C2⁺/ NF+ CelC). Estos resultados están íntimamente relacionados con los obtenidos en el apartado anterior, en el que se observó que el enzima CelC2 puede llegar a suprimir los pulsos de calcio en algunos pelos radicales, lo cual implicaría una disminución en la expresión de ENOD11. Sin embargo, parece que las diferencias obtenidas en los ensayos *in vitro* utilizando los NF y la proteína CelC2 purificados son menos notables cuando se llevan a cabo con las células bacterianas.

En este capítulo, mediante la obtención de un transformante de *Sinorhizobium meliloti* que expresa de forma heteróloga el gen *celC* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* y el análisis de su capacidad infectiva, se ha encontrado un fenotipo similar al descrito previamente en *Trifolium repens*, es decir, la degradación de la punta de algunos pelos radicales y probablemente también del final del canal de infección, manteniendo inalteradas el resto de estructuras.

La cepa silvestre, *S. meliloti* 1021 fue capaz de infectar canónicamente los pelos radicales de raíces de *Medicago sativa*, pero es incapaz de penetrar en *Trifolium repens*, ya que no es su hospedador habitual. La cepa *S. meliloti* 1021C2⁺ que expresa constitutivamente el gen *celC* mostró varias diferencias significativas en la deformación de los pelos radicales de la raíz y en la invasión, tanto de *Medicago sativa* como de *Trifolium repens* como resultado de una extensa degradación de la celulosa no cristalina localizada en la punta del pelo radical. Esto condujo a la invasión masiva de estas células sin la formación de canales de infección.

También se ha comprobado la influencia de la celulasa CelC2 en el diálogo molecular *Rhizobium-leguminosa*. Así, la cepa *Sinorhizobium meliloti* 1021C2⁺ produce un retraso en la nodulación y fijación de nitrógeno y muestra un fenotipo similar en plantas de *Medicago truncatula* y *M. sativa* que en *Trifolium repens*. Además, la aplicación de celulasa CelC2 purificada puede interferir con la naturaleza de los pulsos de calcio inducidos por los factores de nodulación y en la expresión de genes de las nodulinas tempranas en *Medicago truncatula*. Por lo tanto, la planta es capaz de detectar un exceso de celulasas bacterianas alterando las rutas relacionadas con el reconocimiento de bacterias simbióticas y, por tanto, en la formación de nódulos.

CAPÍTULO V

Análisis funcional de la celulasa CelC2 en la biosíntesis de celulosa y la formación de biofilms



CAPÍTULO V: ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA CELULASA CELC2 EN LA BIOSÍNTESIS DE CELULOSA Y LA FORMACIÓN DE BIOFILMS

Uno de los objetivos del proyecto de tesis planteado era obtener mutantes defectivos y superproductores en el gen *celC* de la cepa ANU843 de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *trifolii* y analizar sus características simbióticas. Gracias a ello, hemos comprobado, entre otras cosas, que la celulasa CelC2 es esencial para que se produzca la infección de *Trifolium repens* por parte de *Rhizobium* (Capítulos II y III de esta memoria). Además, como se ha expuesto ampliamente en el capítulo I, el gen *celC* codifica para una endoglucanasa y además forma parte del operón *celABC* implicado en la síntesis de celulosa. Así, nos propusimos estudiar si las cepas mutantes obtenidas presentaban alguna alteración en el fenotipo de la biosíntesis de celulosa.

1. IMPLICACIÓN DE LA CELULASA CELC2 EN LA BIOSÍNTESIS DE CELULOSA

Probablemente la síntesis de celulosa es uno de los mayores procesos bioquímicos que peor se conocen a nivel molecular debido a su complejidad y alta regulación. Considerada una característica típica de las plantas, también se ha descrito su biosíntesis en bacterias como *Gluconacetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Rhizobium leguminosarum* (Ross *et al.*, 1991). Hasta la fecha los procesos mejor estudiados son la síntesis de celulosa en *G. xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Arabidopsis thaliana*. En ambos casos, bacterias y plantas, varias proteínas han sido propuestas para participar en la síntesis de celulosa pero solamente dos se han descrito estar implicadas directamente en este proceso: CesaA y Korrigan en plantas y CelA y CelC2 en bacterias. CesaA y CelA poseen homología con glicosil transferasas mientras que Korrigan y CelC2 presentan homologías con glicosil hidrolasas.

Estudios previos han demostrado que el operón *celABC* de biosíntesis de celulosa está involucrado en el anclaje a los tejidos de la planta en el fitopatógeno *Agrobacterium tumefaciens*, afectando a su virulencia. Dentro de este operón, los genes *celA* y *celC* presentan homologías con los genes *bscA* y *bscZ* de *G. xylinum* que codifican para una celulosa sintetasa y una endoglucanasa, respectivamente. Sin embargo, el gen *celB* no mostró homologías con otros genes, por lo que aún no se conoce claramente su función (Matthyse *et al.*, 1995).

En cultivo puro, *Rhizobium leguminosarum* es capaz de sintetizar microfibrillas de celulosa mediante la polimerización de residuos β 1-4 glucosa (Napoli *et al.*, 1975) que intervienen en el anclaje a las raíces de la planta hospedadora *Trifolium repens* (Mateos *et al.*, 1995). La carencia de biosíntesis de celulosa por mutación de *celA* o *celB* en *R. leguminosarum* bv. trifolii no afecta su capacidad de formar e invadir nódulos en trébol en condiciones controladas de laboratorio (Ausmees *et al.*, 1999).

Sin embargo, este polisacárido se induce en contacto con las raíces de la planta y puede ser necesaria para la infección óptima y la formación de biofilm especialmente en los pelos radicales con mayor longitud (Ausmees *et al.*, 1999; Laus *et al.*, 2005b; Williams *et al.*, 2008) y, probablemente, la adhesión mediada por microfibrillas de celulosa durante la colonización de raíces adquiere mayor importancia en las condiciones de la rizosfera que se dan en suelos naturales, donde las bacterias tienen que competir para sobrevivir y tener acceso a las fuentes de carbono de la planta.

El papel que juegan los enzimas CesA y CelA en la síntesis de celulosa es crucial ya que la mutación de uno de sus genes conlleva a la pérdida de la capacidad de sintetizar celulosa (Ausmees *et al.*, 1999; Peng *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2008). Por su parte, mutantes Korrikan de *Arabidopsis thaliana* presentan un fenotipo consistente en plantas enanas con severas alteraciones en la arquitectura de la pared celular primaria (Nicol *et al.*, 1998). Por el contrario, plantas transgénicas de *A. thaliana* sobreexpresando PaPopCel1 (celulasa del tipo Kor de *Populus tremula*) tienen incrementado el tamaño de todos los órganos examinados (Park *et al.*, 2003). Sin embargo, nada se conoce hasta el momento del efecto de la mutación del gen *celC* en la biosíntesis de celulosa bacteriana.

1.1. Caracterización del fenotipo de las cepas ANU843 Δ C2 y ANU843C2⁺ en relación con la biosíntesis de celulosa

Una vez obtenidos los mutantes defectivos y superproductores de la celulasa CelC2 de la cepa ANU843 de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii, observamos que estas cepas presentaban fenotipos ligeramente alterados en el crecimiento que, en una primera aproximación, relacionamos con el proceso de biosíntesis de celulosa.

1.1.1. Crecimiento en medio sólido

En primer lugar, estas diferencias en crecimiento se observaron al sembrar los microorganismos de estudio en medio sólido. Especialmente en YMA se obtuvieron colonias de distinta morfología y tamaño. Concretamente, la cepa ANU843 Δ C2 (Figura 93 B) formaba colonias más pequeñas y compactas, con una matriz polisacáridica aparentemente más compacta que la observada en la cepa parental ANU843 (Figura 93A).

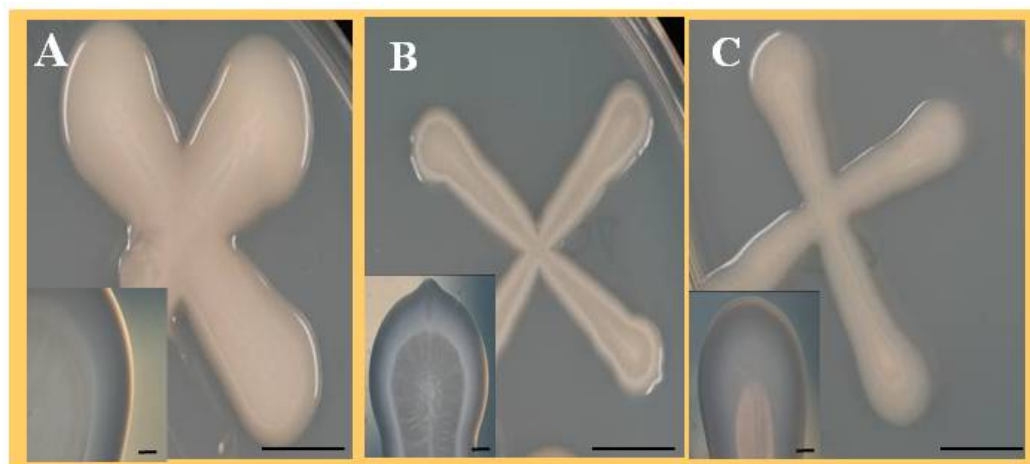


Figura 93. Crecimiento en medio sólido YMA de la cepa silvestre *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843 (A) y los mutantes ANU843ΔC2 (B) y ANU843C2⁺ (C) (Escala 1 cm). En la parte inferior izquierda se puede observar un detalle de las colonias visualizadas con lupa estereoscópica (Escala 1mm).

Por su parte, la cepa ANU843C2⁺ (Figura 93 C) presentaba una ligera diferencia en el tamaño de las colonias y además, la matriz polisacáridica que rodea estas colonias parece ser más laxa que la que se observa en la cepa silvestre ANU843 (Figura 93 A).

Por tanto, podemos afirmar que existen diferencias notables en el tamaño de las colonias y en la mucosidad y el espesor de la matriz polisacáridica que las rodea en las cepas mutantes ANU843ΔC2 y ANU843C2⁺ con respecto a la cepa parental ANU843. Para determinar a qué se deben las diferencias observadas, llevaron a cabo curvas de crecimiento de las cepas de estudio, pero antes se caracterizó su patrón de crecimiento en medio líquido.

1.1.2. Crecimiento en medio líquido

Tras sembrar las cepas de estudio en medio líquido YMB y mantener durante 3 días en agitación (180 r.p.m.) a 28°C se observó que la cepa silvestre (ANU843wt) comienza a formar algunos agregados aislados en la fase estacionaria de su crecimiento. Sin embargo, en la cepa que no produce la celulasa CelC2 (ANU843ΔC2) se observa la formación de una gran cantidad de agregados desde la fase de latencia de su crecimiento (Figura 94 A). Por el contrario, en los cultivos de la cepa superproductora de la celulasa CelC2 (ANU843C2⁺) nunca se llega a observar la formación de estos agregados (Figura 94 A).

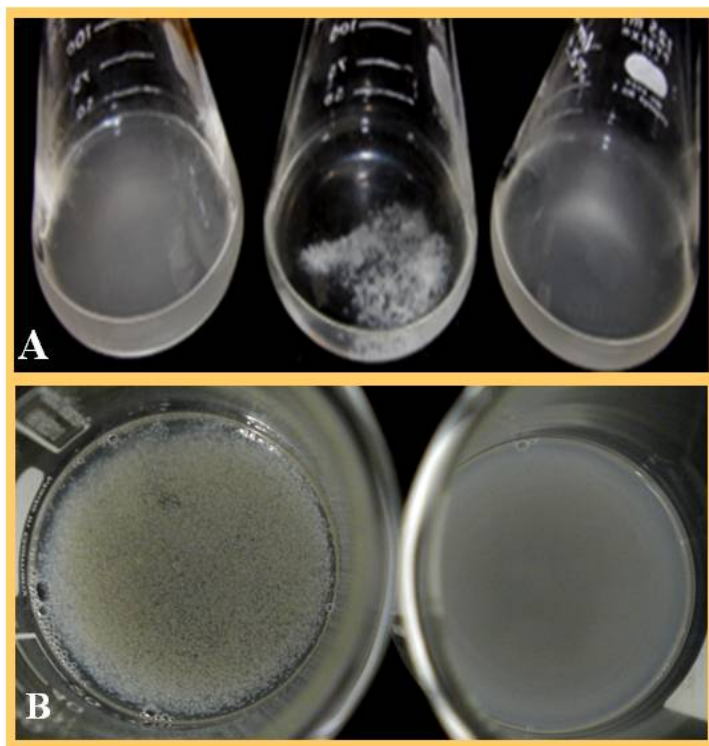


Figura 94. A) Crecimiento en fase estacionaria en cultivo líquido (YMB) en agitación (180 rpm) a 28°C de las cepas utilizadas en este estudio, de izquierda a derecha, la cepa de tipo silvestre ANU843 y sus derivados ANU843 Δ C2 y ANU843C2⁺. B) Suspensión de flóculos formados por la cepa ANU843 Δ C2 después del tratamiento durante 2 horas a 37°C con 10U/ml de celulasa comercial producida por *Trichoderma viride* (derecha) y tratados solamente con tampón en las mismas condiciones (izquierda). Ambos ensayos fueron repetidos al menos en tres ocasiones.

Estos agregados que forman los mutantes ANU843 Δ C2, hacen que esta cepa flocule y precipite en cultivo YMB líquido. Sin embargo, esta característica no se observó en el crecimiento en medio líquido de la cepa complementada ANU843 Δ C2comp (datos no mostrados). Estas diferencias en crecimiento no fueron tan apreciables tras el cultivo en medio líquido TY ni en medio mínimo, lo cual parece apuntar a que la inducción de la biosíntesis de celulosa en estas bacterias se ve fuertemente condicionada por los nutrientes presentes en el medio de cultivo en que se encuentran.

Por otro lado, estos agregados que se forman en cultivo líquido de la cepa ANU843 Δ C2 se disolvieron por completo después del tratamiento durante 2 horas a 37°C y pH 5 con 10U/ml de celulasa comercial producida por *Trichoderma viride* (Sigma) (Figura 94 B), por tanto, parece que la floculación observada es debida a la celulosa ya que la acción de una celulasa comercial es capaz de disolver dichos agregados.

1.1.2.1 Ensayos de floculación

Para llevar a cabo la cuantificación del grado de floculación del mutante ANU843 Δ C2, aparentemente superproductor de celulosa, se llevó a cabo un ensayo de floculación en tubo utilizando medio líquido YMB tal y como se ha descrito para mutantes de *E. coli* (Da Re *et al.*, 2007). Para ello, se tomaron cultivos en fase estacionaria de crecimiento, se estandarizó su densidad óptica (600 nm) a 0,6 y, tras dejarlos en cultivo estático 24 horas, se midió la concentración del cultivo en la zona superior del tubo (Figura 95 A).

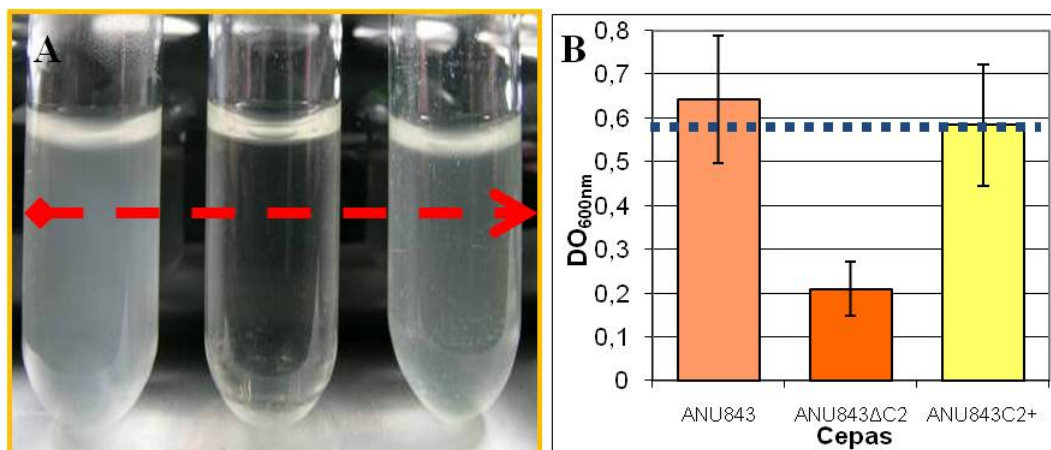


Figura 95. Ensayo de floculación de las cepas de estudio. A) Crecimiento en medio líquido YMB tras 24 horas de cultivo estático de las cepas utilizadas en este estudio. De izquierda a derecha, la cepa de tipo silvestre ANU843 y sus derivados ANU843 Δ C2 y ANU843C2⁺. Previamente, la densidad óptica había sido estandarizada entre las tres cepas. La línea azul discontinua indica el punto donde se tomaron los datos de D.O._{600nm} que se observan en B. La línea roja discontinua muestra el valor inicial de densidad óptica al que fueron estandarizados los cultivos antes de dejarlos en cultivo estático.

Los resultados del ensayo de autoagregación de cada cepa a las 24 horas se observan en la Figura 95 B. Se observó una reducción del 67% en la D.O._{600nm} de la parte superior de los tubos de cultivo estático en la cepa ANU843 Δ C2 en comparación con la cepa de tipo silvestre ANU843. Las cepas ANU843 y ANU843C2⁺ apenas mostraron diferencias entre ellas aunque el crecimiento de la cepa parental fue ligeramente superior durante las 24 horas del ensayo (Figura 95 B).

Por tanto, esta gran agregación de bacterias, que generalmente es mediada por microfibrillas de celulosa (Deinema y Zevenhuizen, 1971), junto con el hecho de que se produzca la eliminación de los flóculos formados por la cepa ANU843 Δ C2 tras el tratamiento con celulasas, constituyen indicios suficientes que indican que se está produciendo un incremento en la producción de microfibrillas de celulosa en este mutante. No obstante y con el objeto de confirmar este incremento, estas cepas fueron sometidas a tinción con distintos colorantes que se unen a la celulosa como el Rojo Congo y Calcoflúor. Sin embargo, para poder interpretar mejor los posibles resultados se llevaron a cabo en primer lugar las curvas de crecimiento.

.1.1.2.2 Curvas de crecimiento

Se realizó un estudio más detallado del crecimiento a lo largo del tiempo de las cepas de estudio con el fin de realizar las curvas de crecimiento en medio líquido YMB (Figura 96 A). Así, se observó que la cepa superproductora de la celulasa CelC2 es capaz de crecer en medio líquido mostrando una curva similar a la de la cepa silvestre ANU843, aunque mostrando una ligera inhibición de crecimiento que se hace más patente al final de la fase exponencial y en presencia de kanamicina en el medio (Figura 96 A). Este hecho puede ser debido, por un lado, a que la necesidad de replicar uno o varios plásmidos adicionalmente por parte de la cepa ANU843C2⁺ provoque un retardo en el metabolismo general de esta bacteria o que además, la superproducción de celulasa en sí misma esté ligeramente inhibiendo su crecimiento bien de forma directa o a través del efecto que pueda tener en la producción de celulosa por parte de esta bacteria.

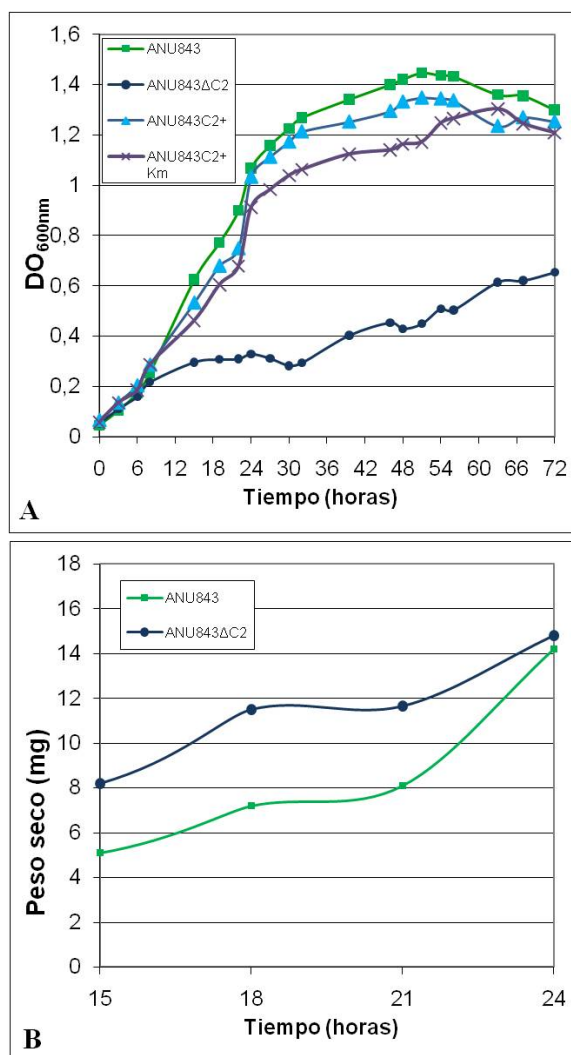


Figura 96. Curvas de crecimiento de las distintas cepas de estudio en medio YMB. A) Crecimiento determinado por la densidad óptica a 600 nm del cultivo de las cepas ANU843, ANU843ΔC2 y la cepa ANU843C2⁺ tanto en presencia como en ausencia de Kanamicina en el medio. B) Determinación del peso seco de los cultivos de las cepas ANU843 y ANU843ΔC2 para evitar las interferencias de la floculación.

Por su parte, la cepa ANU843 Δ C2 presentó un crecimiento aparentemente inferior en medio líquido (Figura 96 A). Sin embargo, estos resultados se deben a que la severa floculación de esta especie en medio líquido (Figuras 94 y 95) provoca estimaciones en la densidad óptica del cultivo que reflejan de forma errónea la cantidad real de células presentes. Tampoco el recuento de Unidades Formadoras de Colonias demostró ser una buena técnica debido a que la formación de flóculos genera una gran desviación entre los datos obtenidos por el error que se produce durante las diluciones seriadas de estos cultivos (datos no mostrados).

Sin embargo, la estimación del peso seco de los cultivos a lo largo de distintos puntos de la fase exponencial de crecimiento de esta cepa y la comparación con los valores obtenidos con la cepa silvestre nos resultó el modo más fiable de determinación de su crecimiento (Figura 96 B). Así, se pudo determinar que no se producen diferencias significativas en el crecimiento de la cepa ANU843 Δ C2 con respecto a la ANU843wt ya que incluso los valores obtenidos en el peso seco de la primera fueron superiores. Estas diferencias quizás sean debidas a la mayor producción de celulosa por parte de la cepa ANU843 Δ C2 a lo largo de la fase exponencial de crecimiento, ya que los valores se igualan en la fase estacionaria, momento en el que la cepa parental ANU843 comienza a formar agregados y por tanto a sintetizar celulosa.

1.1.3. Tinción de celulosa

Se han descrito diferentes ensayos cualitativos para la selección de microorganismos productores de celulosa gracias a la capacidad que tienen algunas sustancias de unirse de forma específica a esta molécula, como el Rojo Congo o el Calcoflúor (Ausmees *et al.*, 1999). No obstante, los datos obtenidos deben completarse con análisis genéticos y químicos para confirmar su presencia.

1.1.3.1 Tinción con Rojo Congo

Como se ha expuesto anteriormente, la mayoría de las cepas tipo oficiales de cada uno de estos taxones descritas en el momento de comenzar este estudio dentro de los géneros denominados como “verdaderos rhizobia” y algunos “no-rhizobia” pertenecientes a las α - Proteobacterias e incluidos en los géneros *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum* y *Devosia* capaces de nodular, producen celulosa según la tinción llevada a cabo con Rojo Congo (*ver capítulo I*).

Utilizando este procedimiento, se observó la capacidad de unión a este colorante de las cepas objeto de estudio tras 7 días de crecimiento en placas de YMA suplementadas con Rojo Congo. Este ensayo se repitió al menos tres veces con cada cepa, y los resultados mostrados corresponden con la intensidad detectada más frecuentemente (Figura 97) según la escala con cuatro niveles que fue elaborada a partir de especies tomadas como representativas de cada uno de ellos (Figura 36).

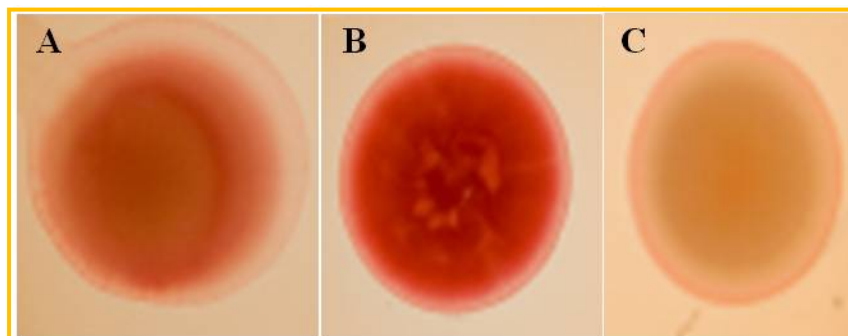


Figura 97. Crecimiento en cultivo sólido estático con YMA + Rojo Congo, colorante que se une de forma específica a la celulosa tiñendo de rojo las colonias capaces de sintetizarla. A) Cepa silvestre de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 (a la izquierda, celulosa ++) B) ANU843ΔC2 (celulosa +++ y C) ANU843C2+ (celulosa-).

Como se puede observar, la capacidad de producción de celulosa varía notablemente entre las cepas de estudio (Figura 97). Así, la cepa ANU843ΔC2 presentó una mayor capacidad para producir celulosa que la cepa silvestre ya que se tiñe de forma muy intensa por el Rojo Congo. Mientras que por su parte, la cepa superproductora de la celulasa CelC2 mostró una afinidad nula por este colorante (Figura 97 C). Esto demuestra que el Rojo Congo solamente se une a la celulosa en *Rhizobium*, y no a otras proteínas externas de membrana como en otras bacterias (Theisen *et al.*, 1993), y que los mutantes superproductores de la celulasa CelC2 no producen ninguna sustancia que se una al Rojo Congo.

Por tanto, estos resultados parecen confirmar que las colonias de los mutantes knock-out y superproductores de la celulasa CelC2 muestran una mayor y menor presencia de celulosa respectivamente en comparación con la cepa silvestre ANU843. Sin embargo, estas diferencias no fueron tan notables cuando se llevaron a cabo cultivos en medio mínimo o TY sólidos conteniendo las mismas cantidades de Rojo Congo (datos no mostrados). Este resultado concuerda con los obtenidos en medio líquido, donde no se observaba la floculación masiva de la cepa ANU843ΔC2 cuando ésta era cultivada en TY o Medio mínimo líquidos. Por tanto, aunque la tendencia observada es similar en todos los medios, es en medio YMA donde se hace más notable.

.1.1.3.2 Tinción con Calcoflúor

Esta molécula fluorescente tiene la capacidad de unirse a la celulosa, entre otros polímeros con enlaces β -1,4; de forma que una vez llevada a cabo la tinción, y mediante microscopía de fluorescencia es posible detectar la presencia o ausencia de microfibrillas de naturaleza celulósica así como su morfología y disposición. Para comprobar cómo este fenotipo afecta a la producción de microfibrillas de celulosa en estas bacterias, se llevaron a cabo ensayos de tinción con Calcoflúor y posterior visualización de las cepas al microscopio de fluorescencia. Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la figura 98.

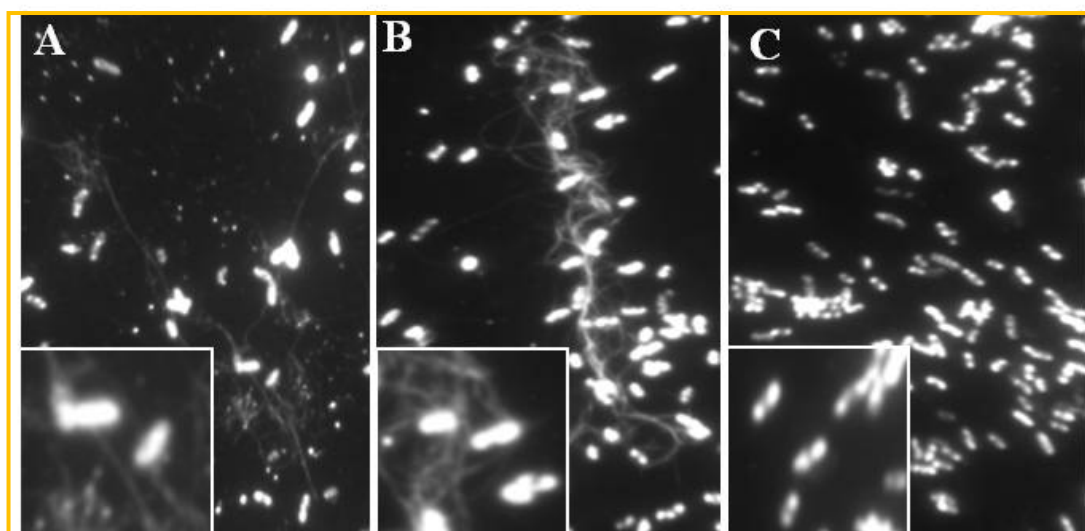


Figura 98. Tinción con Calcoflúor y posterior visualización mediante microscopía de fluorescencia de las cepas utilizadas en este estudio: ANU843 (A) y los mutantes ANU843ΔC2 (B) y ANU843C2⁺ (C). En la esquina inferior izquierda se muestra un detalle de las imágenes obtenidas donde se puede observar claramente las microfibrillas de naturaleza celulósica.

Los resultados obtenidos muestran que tanto la cantidad como longitud de las microfibrillas de celulosa fueron mayores en el mutante ANU843ΔC2 que en la cepa ANU843 al ser visualizadas por tinción con Calcoflúor (Figura 98) lo cual hizo imposible la determinación de su longitud media aproximada (Tabla 27). Por otro lado, no se observa la producción de estas microfibrillas en el mutante ANU843C2⁺ (Figura 98 C). Sin embargo, en el interior de las células aparecen acumulaciones en ambos polos de la bacteria que presentan una gran fluorescencia. Esto parece indicar que se produce una acumulación de celulosa en el interior de la bacteria que no deriva en la formación de las microfibrillas externas. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el tamaño de las células de las distintas cepas de estudio (Tabla 27).

Tabla 27. Determinación de la capacidad de floculación y la longitud de las microfibrillas de celulosa y de las células de las cepas de estudio mediante observación al microscopio tras tinción con Calcoflúor. Los valores recogidos muestran la determinación de al menos 10 muestras en cada caso.

| Cepa | Floculación | Longitud μ fibrillas (μ m) | Longitud células (μ m) |
|-----------------------|-------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| ANU843 | +/- | 8,34 \pm 1,42 | 1,80 \pm 0,11 |
| ANU843ΔC2 | ++ | > 15 | 1,79 \pm 0,17 |
| ANU843C2 ⁺ | - | 0 | 1,77 \pm 0,21 |

En el modelo propuesto por Peng y col. (2002) para la síntesis de celulosa en plantas, la proteína CesaA catalizaría la elongación de la cadena de 1,4- β -glucano al transferir restos de UDP-Glucosa al intermediario sitosterol- β -glucósido para formar sitosterol-celodextrinas. La celulasa codificada por el gen *Kor*, necesaria para la síntesis de celulosa en plantas, actuaría liberando el sitosterol- β -glucósido de la cadena del polímero de celulosa que se está formando, tal y como en el modelo que proponemos para la biosíntesis de celulosa en bacterias. Este modelo se desarrollará con mayor profundidad en el apartado “Discusión General” de esta memoria.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede llevar a cabo una caracterización general las distintas cepas de este estudio en función de la capacidad de producir celulosa:

- ANU843wt: Cepa silvestre de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ANU843. Es capaz de producir celulosa *in vitro* y microfibrillas de celulosa *in vivo*.

- ANU843 Δ C2: mutante defectivo en la síntesis de la celulasa CelC2. Forma agregados en cultivo líquido, presenta una mayor producción de celulosa *in vitro* y produce un incremento considerable en la longitud de las microfibrillas de celulosa con respecto a la cepa silvestre.

- ANU843C2⁺: cepa recombinante superproductora de la celulasa CelC2. No forma agregados en medio líquido, presenta una menor producción de celulosa *in vitro* y si bien puede que sintetice una pequeña cantidad de celulosa, ésta se limita a la superficie y/o interior celular no observándose en ningún caso microfibrillas de celulosa en el exterior de la célula.

Por lo tanto, el gen *celC* está involucrado en la formación y elongación de las microfibrillas de celulosa. Proponemos un sistema modelo en el que en el mutante Δ *celC* los oligómeros de celulosa sintetizados por el gen *celA* se alargan indefinidamente en ausencia de una endoglucanasa, causando microfibrillas muy largas que provocan la formación de agregados entre las células bacterianas que flocculan en medio líquido. Por el contrario, en los cultivos del mutante *celC*⁺, hay un exceso de actividad correspondiente a esta endoglucanasa que conlleva una degradación incontrolada de los oligómeros de celulosa sintetizados por CelA, impidiendo su transporte y la posterior formación de las microfibrillas que se extienden fuera de la célula. Además, parece que estos oligómeros degradados sin la compañía de lípido transportador se acumulan dentro de la célula, precisamente en las áreas de crecimiento (polos y septo).

Finalmente, ya que las cepas mutantes obtenidas han presentado fenotipos alterados consistentes en un aumento y disminución respectivamente de la biosíntesis de celulosa, podrían constituir un excelente modelo para la determinación de la implicación de la celulosa producida por *Rhizobium* en la colonización de la rizosfera y las raíces de las plantas y en la formación de biopelículas.

2. IMPLICACIÓN DE LA CELULOSA EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

Los microorganismos pueden vivir y proliferar como células individuales en el medio o crecer formando biopelículas o “biofilms”: comunidades multicelulares muy bien organizadas dentro de una matriz que ellas mismas han sintetizado para asociarse a superficies o interfases. Una característica de los rizobios es su capacidad de formar estos agregados para adherirse tanto a la raíz de las plantas como a las partículas de la rizosfera y así evitar ser desplazados de sus nichos ecológicos (Fujishige *et al.*, 2006b).

En los últimos años se han identificado factores que intervienen en el desarrollo de las biopelículas comunes entre especies bacterianas filogenéticamente alejadas. Entre estos factores se encuentran diversas proteínas y algunos exopolisacáridos. Inicialmente no se relacionó la biosíntesis de celulosa con la formación de biofilms, pero se ha determinado que este biopolímero constituye el compuesto mayoritario de la matriz de las biopelículas en diversas especies bacterianas (Lasa y Penades, 2006). La implicación de la celulosa en la formación de biofilms *in vitro* se ha caracterizado en otras bacterias Gram- como *E. coli* o *S. enteritidis* (Da Re *et al.*, 2007; White *et al.*, 2003).

La celulosa también está involucrada en el anclaje a los tejidos vegetales en el patógeno *A. tumefaciens*, donde interviene en la formación de biofilms y afecta a su virulencia. Sin embargo, mutantes incapaces de sintetizar celulosa siguen produciendo tumores en plantas (Matthysse *et al.*, 2005). Por otro lado, en *Rhizobium leguminosarum* biovar. trifolii se ha descrito que las microfibrillas de celulosa están asociadas a la adhesión inicial a las raíces de trébol (Mateos *et al.*, 1995). Sin embargo, el papel de la celulosa en la formación y maduración de los biofilms en *Rhizobium* no ha sido totalmente caracterizado.

Por ello, se han puesto a punto una serie de métodos con el objetivo de evaluar cualitativa y cuantitativamente la formación de estas biopelículas. Estos ensayos incluyen experimentos *in vitro*, utilizando distintos sustratos abióticos que simulan los componentes de la rizosfera (arena, vidrio o plásticos sintéticos) e *in vivo*, mediante ensayos con plantas (análisis de la capacidad de adhesión a la raíz, inoculación con bacterias marcadas con proteínas fluorescentes para visualizar la estructura de la matriz mediante microscopía confocal, etc...) (Fujishige *et al.*, 2006a; Fujishige *et al.*, 2008; Rinaudi *et al.*, 2006). Mediante estos ensayos se pudo evaluar cualitativa y cuantitativamente la formación de biopelículas por parte de estos mutantes que tienen alterada su capacidad de formación de microfibrillas de celulosa, tal como se ha descrito en la sección anterior. Los resultados muestran distintos patrones de comportamiento en la formación de biofilms tanto en sustratos abióticos como en plantas.

2.1. Ensayos *in vitro*

La primera observación que nos llevó a pensar en las diferencias en la formación de biopelículas, fue la formación de un “anillo” de bacterias adheridas en la superficie del vidrio en los cultivos líquidos de las cepas de estudio (Figura 100 D). En ellos, tras 3 días en agitación, se observó que los anillos formados por las biopelículas en la interfase de cultivo líquido-aire en la cepa ANU843 Δ C2 parecían ser más gruesos y más compactos, pero en realidad se desprendían del cristal con mucha facilidad en comparación con el tipo silvestre ANU843 (de unos 5 mm). Por otra parte, el mutante ANU843C2⁺ formaba anillos que eran mucho más delgados (3mm aproximadamente). Estos datos sugerían una posible implicación de la celulasa *celC* en la formación de biofilms, por tanto se propuso continuar estudiando y cuantificando este hecho.

2.1.1. Ensayo en placas de microtitulación de PVC

En un examen de crecimiento de las cepas mutantes en placas de microtitulación, se concluyó que pese a que el medio en el que mejor se observan las diferencias en la producción de celulosa es YMB, éste no resulta el más adecuado para estudiar la formación de biofilms. Esto es debido a que existen diferencias significativas entre el crecimiento de las bacterias derivadas por la floculación de la cepa ANU843 Δ C2, lo que dificulta la normalización inicial de los cultivos y, por tanto, la comparación de la capacidad de formar biofilms entre las cepas.

Sin embargo, en los cultivos en medio líquido tanto en TY como en medio mínimo con manitol, no hubo diferencias significativas en el crecimiento entre ellas en estas condiciones (datos no mostrados), pero sí se observaron diferencias en la capacidad de formar biofilm que fueron estadísticamente significativas (Figura 99 C, D). La cepa mutante ANU843 Δ C2 mostró una disminución de entre el 30 y el 50% en la formación del biofilm en los ensayos de placas multipocillo en ambos medios y a distintos tiempos de medida respecto a la cepa silvestre. Por su parte, la formación de biopelículas fue de aproximadamente un 30-60% menor a las 24 y 48 horas en ANU843C2⁺ comparada con ANU843 (Figura 99 C, D).

El fenotipo más sorprendente se encontró en el mutante ANU843 Δ C2, ya que antes de lavar los pocillos, las biopelículas de este mutante superproductor de microfibrillas de celulosa parecían ser robustas y compactas. Sin embargo, los agregados celulares de esta cepa, fueron fácilmente eliminados con cada sucesivo paso de lavado, mientras que casi todas las células del tipo silvestre permanecieron firmemente unidas al poliestireno, dando al final una señal significativamente mayor.

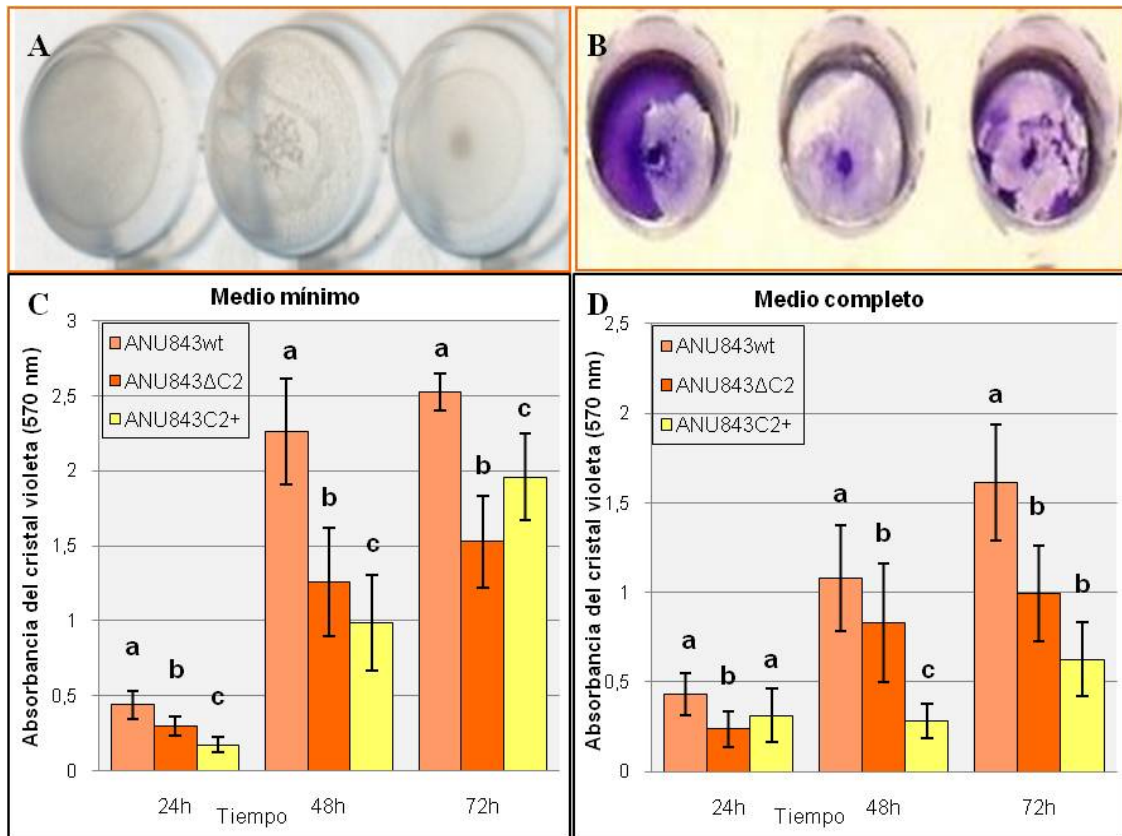


Figura 99. Ensayo en placas de poliestireno de las distintas cepas de estudio. De izquierda a derecha, la cepa parental ANU843 y sus derivados ANU843ΔC2 y ANU843C2⁺. A) Tras distintos tiempos de incubación en ausencia de movimiento se retiró el medio de cultivo y se observaron diferencias en la capacidad formadora de biofilms entre ellas. B) La capacidad formadora de biofilms en distintos medios y tiempos de incubación de las cepas de estudio se midió tras tinción con Cristal Violeta (CV) de las bacterias que han quedado formando una película en el fondo de los pocillos de las placas de microtitulación. C y D) Las gráficas representan los valores de absorbancia del CV (570 nm) obtenidos tras disolver las películas en etanol: acetona 4:1. Antes del revelado, se determinó la D.O._{600nm} en un lector de placas para comprobar que no hubo diferencias en la tasa de crecimiento entre las distintas cepas. Cada punto de datos es el promedio de al menos 20 pocillos. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Para cada experimento y tiempo, los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente según el test LSD protegido de Fisher para P = 0,01. En ambos medios, se encontraron diferencias significativas entre las cepas en estudio, aunque en medio completo las diferencias fueron menos notables. Estas diferencias consisten en una reducción considerable de la capacidad formadora de biofilms por parte de las cepas mutantes ANU843ΔC2 y C2⁺.

2.1.2. Ensayo de adhesión a superficies de vidrio y PVC

Como se comentó anteriormente, la formación de un “anillo” de bacterias adheridas en la superficie del vidrio en los cultivos líquidos de las cepas de estudio (Figura 100 D) presentó una morfología diferente. Para estudiarla con más detalle, se analizó la capacidad de los mutantes marcados con una proteína verde fluorescente de formar biofilms en láminas de PVC y su morfología (Figura 100 A-C). Los experimentos en las láminas de PVC están diseñados para examinar la

estructura tridimensional de las biopelículas formadas en los bordes de las superficies inertes.

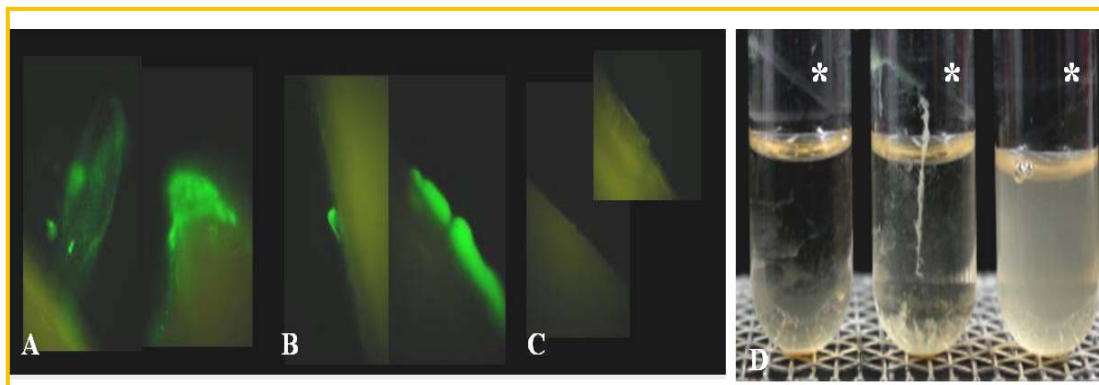


Figura 100. Formación de biofilms en láminas de PVC (A-C) por parte de las cepas de estudio: ANU843 (A) y sus derivados ANU843ΔC2 (B) y ANU843C2⁺ (C). D) Crecimiento en tubos de vidrio con 3 ml de cultivo (TY) para observar la formación del anillo de bacterias adheridas a la pared alrededor del tubo (*), de izquierda a derecha, la cepa tipo silvestre ANU843 y sus derivados ANU843ΔC2 y ANU843C2⁺.

Estos ensayos sirven para examinar la estructura tridimensional de los biofilms maduros formados en los extremos de una superficie inerte, como los que se observan en la cepa silvestre (Figura 100 A). Esta morfología tridimensional contrasta con la producida por el mutante *ΔcelC* (Figura 100 B), en el que se observan agregados de células gruesos y compactos que aparentemente no se unen a la superficie. Así, se confirma que esta cepa no forma verdaderos biofilms, sino agregados inestables sobre las superficies, de forma que fácilmente son retirados. Este hecho explica que exista un número significativamente inferior de bacterias adheridas tanto en el ensayo en pocillos (Figura 99) como en el ensayo de arena (Figura 101). Por otra parte, las bacterias marcadas con GFP del mutante *celC*⁺ no dieron lugar a la formación de un biofilm maduro y tridimensional, sino que en la mayoría de las ocasiones se observaba una monocapa con pocas bacterias unidas unas a otras (Figura 100 C), coincidiendo también con los datos obtenidos previamente.

2.1.3. Ensayo de adhesión a arena

La arena es un medio natural para muchas bacterias y además es una matriz menos compleja que el suelo, lo que permite evaluar el potencial de los mutantes para formar biofilms en un sustrato natural tanto por microscopía confocal como mediante el recuento de las bacterias adheridas a los granos de arena. Por tanto, a continuación se decidió llevar a cabo un ensayo para evaluar la formación de biopelículas utilizando arena como sustrato. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 101.

Tras una semana de incubación, se tomaron alícuotas equivalentes de los granos de arena, se lavaron para eliminar las bacterias que no se habían adherido a ellos y se determinó la capacidad de formar biofilms observando al microscopio

confocal y de fluorescencia dichas partículas. Así, se pudo observar como la cepa ANU843 forma verdaderas estructuras tridimensionales mientras que la cepa ANU843 Δ C2 forma una lámina más fina y débil que recubre los granos de arena y la cepa ANU843C2⁺ apenas se adhiere a éstos. También se evaluó esta capacidad cuantitativamente, realizando recuentos de las bacterias adheridas a los granos de arena. En estos ensayos también se observaron diferencias significativas entre la capacidad de adhesión de las distintas cepas de estudio (Figura 101).

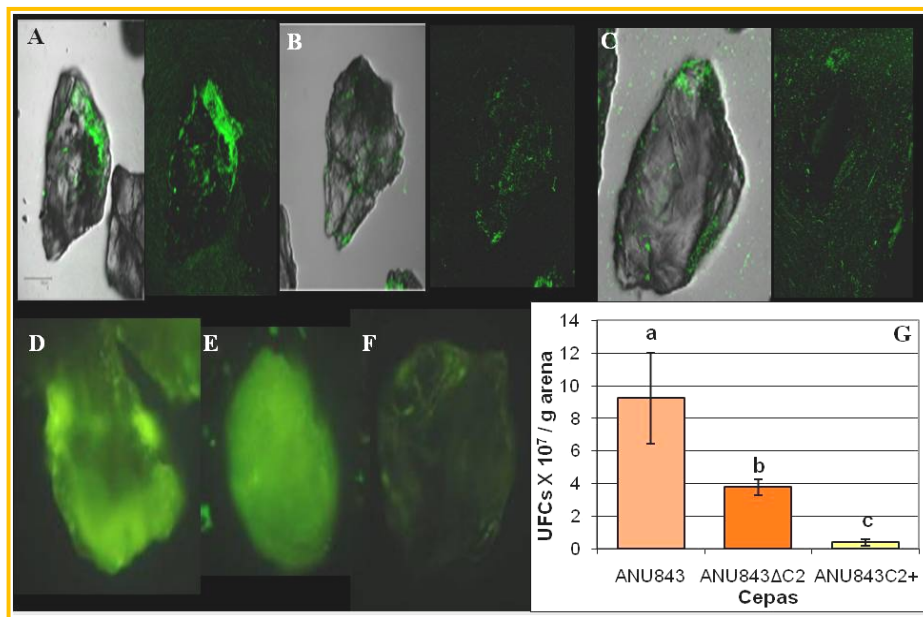


Figura 101. Ensayo de adhesión a arena de las cepas de estudio marcadas con GFP observadas mediante el microscopio confocal (A-C) y de fluorescencia (D-F). La cepa silvestre formó verdaderas estructuras tridimensionales (A, D), mientras que el mutante ANU843 Δ C2 formó una capa delgada y débil que recubre los granos de arena (B, E) y la cepa ANU843C2⁺ apenas se adhiere a los granos de arena (C, F). G) También se evaluó cuantitativamente la capacidad de adhesión, llevando a cabo el recuento de las UFC adheridas por gramo de arena. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Cada experimento se repitió tres veces. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente según el test de Fisher LSD para P = 0,01.

Estos resultados permiten afirmar que el mutante ANU843 Δ C2 no forma biopelículas maduras en sustratos inertes, sólo agregados compactos e inestables en las superficies que son fácilmente retirados durante la fase de lavado de los diferentes experimentos. Esto explica por qué hay un número significativamente menor de bacterias adheridas tanto en el ensayo multipocillo como en las láminas de PVC y en el ensayo de adhesión a arena. Por otro lado, la cepa ANU843C2⁺ se adhiere a las superficies ligeramente pero sin formar estructuras tridimensionales. Estos experimentos confirman el papel del gen *celC* en la modulación de la estructura de los biofilms *in vitro* a través de su participación en la biosíntesis de celulosa.

2.2. Ensayos *in planta*

Los rizobios son capaces de adherirse a las raíces de las plantas y, en general, de colonizar estas estructuras vegetales de forma más eficiente en leguminosas compatibles que en las raíces de plantas no leguminosas (Fujishige *et al.*, 2006b). En este trabajo se propuso llevar a cabo un examen de la capacidad de adhesión y la formación de biopelículas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* en su planta hospedera *Trifolium repens* para ampliar los resultados encontrados en los ensayos llevados a cabo en superficies abióticas. Así, se comprobó que todas las cepas fueron capaces de colonizar las raíces, especialmente las zonas de los pelos radicales en crecimiento, y se mantuvieron firmemente unidas a su superficie, incluso después de varios lavados (Figura 102). También el mutante que no sintetiza celulosa *in vitro* (ANU843C2⁺) fue capaz de fijarse a la superficie de las raíces de las plantas (Figura 102 C, F), lo que demuestra que la celulosa bacteriana no es imprescindible para este proceso.

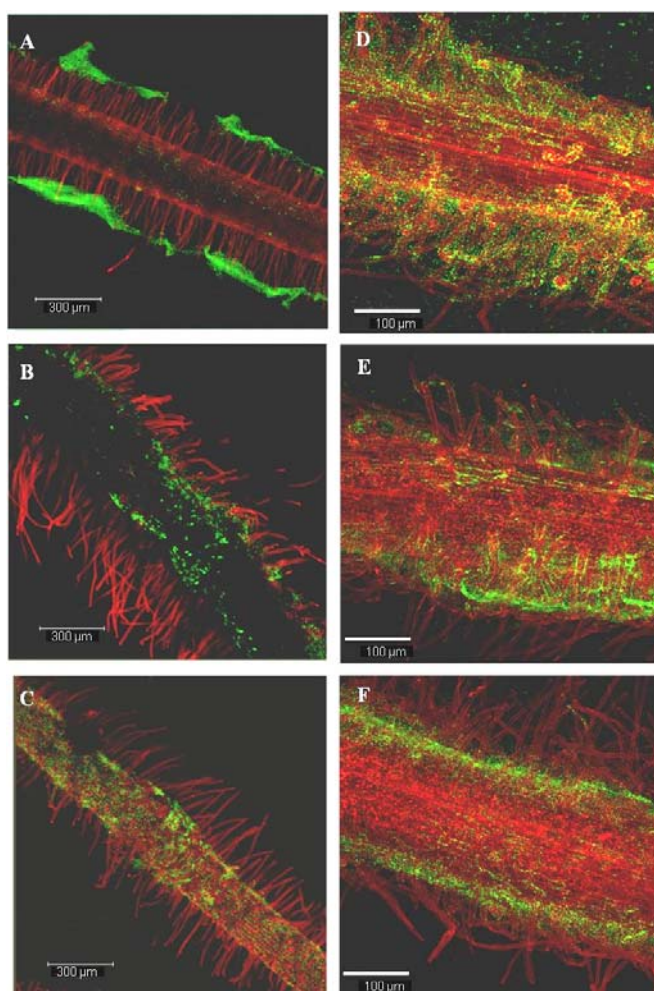


Figura 102. Ensayos *in planta* utilizando *Trifolium repens* como sustrato teñido con ioduro de propidio para estudiar la capacidad de formar biofilms de las distintas cepas marcadas con proteínas fluorescentes mediante microscopía confocal. En ellos se puede observar como la cepa silvestre ANU843 (A, D) forma biofilms tridimensionales que cubren tanto la superficie de la raíz como los pelos radicales. Por su parte, la cepa ANU843ΔC2 forma fuertes agregados que no cubren homogéneamente la raíz (B, E) y la cepa ANU843C2⁺ aparece recubriendo únicamente la superficie de la raíz (C, F).

Sin embargo, un estudio más detallado muestra algunas diferencias entre las cepas de estudio en relación a su capacidad de colonizar la raíz. Así, en las raíces inoculadas con la cepa ANU843, la mayoría de los pelos radicales se encontraban recubiertos con bacterias que formaban un biofilm tridimensional (Figura 102 A, D). Por el contrario, en las plantas inoculadas con el mutante ANU843 Δ C2 se observó la formación de agregados más compactos que tienden a cubrir la raíz de forma irregular (Figura 102 B, E). Sin embargo, las células del mutante ANU843C2⁺ se adhieren a la superficie de la raíz pero no forman una matriz tridimensional alrededor de los pelos radicales (Figura 102 C, F).

Para cuantificar estas diferencias, las raíces de trébol fueron procesadas y sometidas a sonicación para posteriormente llevar a cabo el recuento de unidades formadoras de colonias, dando como resultado el valor relativo por gramo de raíz (Figura 103). En el caso de la cepa ANU843wt, se obtuvo un promedio de $5,8 \times 10^7$ unidades formadoras de colonias por g de raíz fresca, superior al obtenido en las muestras inoculadas con la cepa ANU843 Δ C2, donde solo se contabilizaron $3,0 \times 10^7$ ufc por g de raíz de trébol, demostrando que, como ocurre en las superficies abióticas, esta cepa forma agregados en las superficies que son inestables y se liberan fácilmente.

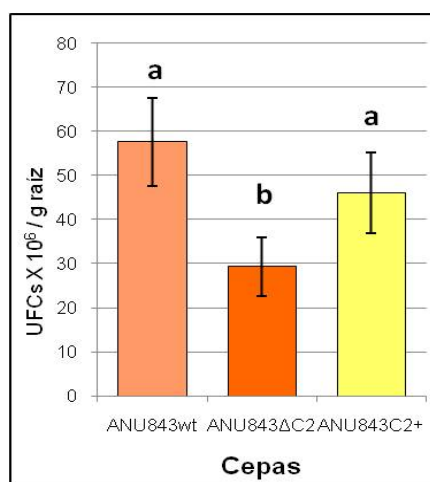


Figura 103. Unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de raíz que aparecen tras el recuento de las distintas cepas de estudio. Cada punto de datos es el promedio de al menos 9 determinaciones. Las barras indican el error estándar. Las raíces fueron procesadas a las 72 h después de la inoculación con las distintas cepas de estudio.

Por su parte, la cepa ANU843C2⁺ mostró un valor inferior de bacterias adheridas a la superficie por gramo de raíz al de la cepa silvestre ($4,6 \times 10^7$). La incapacidad para formar estructuras tridimensionales observada en los ensayos llevados a cabo con este mutante probablemente sea el motivo por el que se produce una menor adhesión bacteriana, sin embargo, no existen diferencias estadísticamente significativas con respecto a la cepa silvestre.

Por tanto, la capacidad de adhesión de la cepa superproductora de la celulasa CelC2 es considerablemente mayor en plantas en comparación con el fenotipo observado en sustratos abióticos. Este hecho podría ser debido a la falta del antibiótico selector en los ensayos *in planta* que provoque que se pierda el

plásmido pJZC2 y la bacteria recupere la capacidad de sintetizar celulosa normalmente. También es posible que exista una implicación de la planta en la adhesión bacteriana a la superficie de la raíz, bien de forma directa debida a la propia producción de celulosa vegetal o a la inducción por parte de la planta de la biosíntesis de celulosa bacteriana; o de forma indirecta inhibiendo el enzima (CelC2) mediante la producción de proteasas. También puede que existan diferencias entre la capacidad de las cepas de estudio de adherirse a la superficie de la raíz y a los pelos radicales, por ello nos propusimos estudiar con más detalle este fenotipo.

2.2.1. Adhesión y colonización de la superficie de la raíz

Para analizar el efecto de la superproducción de la celulasa CelC2 en la adhesión de estos mutantes a la superficie de la raíz se llevaron a cabo un estudio utilizando microscopía electrónica de barrido (Figura 104). Así, se comprobó que en las plantas inoculadas con la cepa ANU843, la mayor parte de las células (83%) se encontraban unidas a la superficie de la raíz por medio de microfibrillas de celulosa, aparentemente de origen bacteriano (Figura 104 A, C).

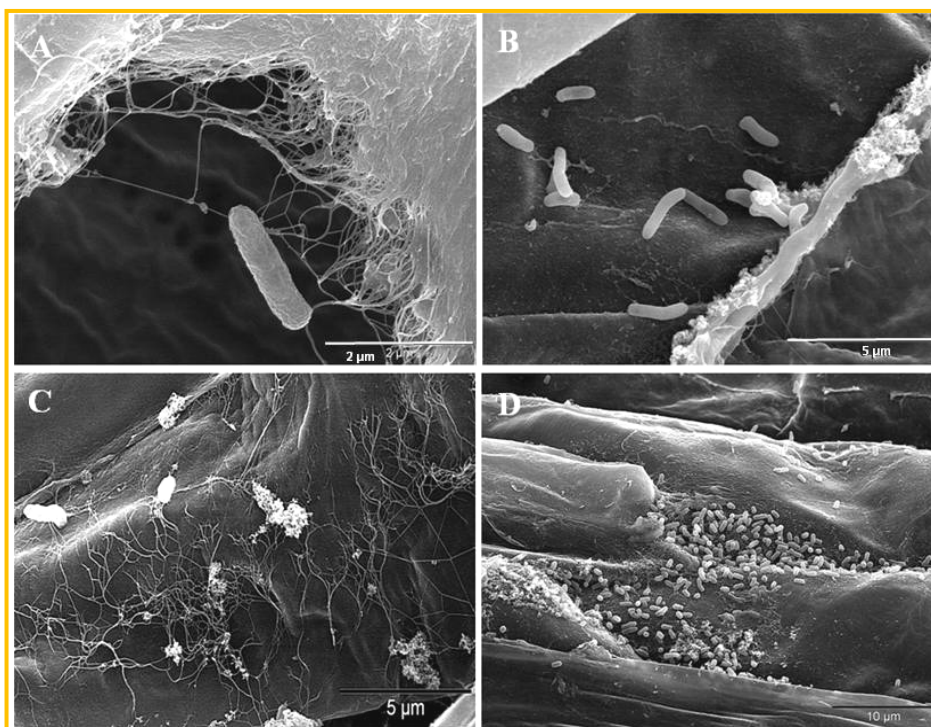


Figura 104. Microscopía electrónica de barrido de la superficie de la raíz de plantas de *Trifolium repens* inoculadas con la cepa *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843wt (A, C) o la cepa superproductora de la celulasa CelC2 ANU843C2⁺.

Sin embargo, en las muestras inoculadas con la cepa superproductora del enzima CelC2, ANU843C2⁺, se observa un menor porcentaje de bacterias recubiertas por microfibrillas de celulosa (50%) (Figura 104 B, D). Sin embargo,

se observaron también una gran cantidad de células adheridas a la superficie de la raíz. Estas observaciones parecen confirmar que la celulosa no es la única molécula que interviene en la adhesión a la raíz, aunque favorezca su firme unión y la formación de agregados. También nos indican que, aunque en un porcentaje inferior, siguen apareciendo microfibrillas de celulosa en las plantas inoculadas con el mutante CelC2⁺.

2.2.2. Adhesión y colonización de los pelos radicales

Por último, se determinó la capacidad de colonización de los pelos de la raíz en detalle (Figura 105). Las imágenes, tomadas mediante microscopía confocal de fluorescencia, muestran la capacidad de la cepa silvestre ANU843 (Figura 105 A) y del mutante ANU843ΔC2 (Figura 105 B) de adherirse a la punta de los pelos formando el “cap”, aunque la segunda cepa lo hace en ocasiones formando agregados más compactos. En la microfotografía C de la figura 105 se puede observar cómo el mutante superproductor del enzima CelC2 aparece en la mayoría de los casos recubriendo únicamente la superficie de la raíz, agrupándose con más frecuencia en grupos discretos, y no se observó la formación del “cap” en casi ninguno de los pelos radicales estudiados. Estos resultados podrían confirmar que la celulosa bacteriana no es necesaria para mediar la adhesión a los pelos radicales, en los que probablemente sea suficiente la acción de las lectinas y ricadhesinas para llevar a cabo el anclaje de las bacterias. Sin embargo, la ausencia de este polímero probablemente evita la formación de biopelículas tridimensional también en la punta de los pelos radicales, tal como han sugerido otros autores (Williams *et al.*, 2008).

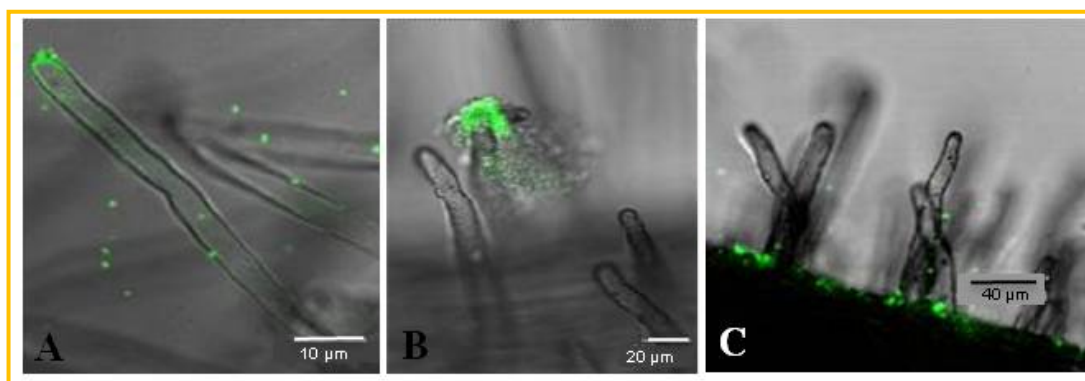


Figura 105. Sucesión de eventos relacionados con la adhesión de las cepas de estudio ANU843 (A), ANU843ΔC2 (B) y ANU843C2⁺ (C) marcadas con GFP en pelos radicales de trébol.

Por consiguiente, tanto los ensayos *in vivo* como *in vitro* muestran distintos comportamientos en la formación de biofilms entre las cepas de estudio, lo cual permite afirmar que la celulasa CelC2 de *Rhizobium* se encuentra implicada en la adhesión de las bacterias a la planta y en la formación de biofilms, probablemente a través de su implicación en la biosíntesis de celulosa.

DISCUSIÓN GENERAL

La fuerte dependencia actual de los costosos fertilizantes nitrogenados para mantener las necesidades de producción agrícola de la población mundial, ha generado un incremento en la contaminación ambiental que a su vez provoca graves consecuencias para la salud humana. Una de las alternativas que se plantea ante este problema es la potenciación de la fijación biológica de nitrógeno, que ofrece un medio económicamente atractivo y ecológicamente más saludable para reducir las necesidades de fertilización química optimizando el uso de los recursos naturales existentes.

Entre las distintas interacciones que existen en la naturaleza entre microorganismos y plantas, la simbiosis que se establece entre el numeroso y heterogéneo grupo de bacterias fijadoras de nitrógeno conocidos como rizobios y algunas plantas de la familia *Leguminosae* son las que ponen de manifiesto un mayor grado de especificidad y de reconocimiento mutuo entre las partes implicadas. Esta interacción comienza con el intercambio de señales bioquímicas emitidas por ambos, macro y microsimbionte, de forma que el proceso infectivo culmina con la formación en la planta de una nueva estructura altamente organizada, el nódulo, que puede considerarse como un nuevo órgano en el que se fija el nitrógeno atmosférico, para que de esta forma sea asimilado por el vegetal.

La inoculación de cepas de *Rhizobium* seleccionadas para su utilización como biofertilizantes de forma eficiente debe considerar, entre otros factores, la capacidad del microorganismo de invadir su planta hospedadora de una manera efectiva sin causar daños. La infección de las plantas leguminosas por los rizobios es un proceso extremadamente complejo y regulado. En los estadios iniciales del establecimiento de la simbiosis, los rizobios penetran en la raíz de su leguminosa hospedadora a través de pelos radicales en los que se genera un canal de infección, vía más frecuente y mejor estudiada, que permite a las bacterias alcanzar las células del córtex. El establecimiento de una simbiosis eficiente supone, que el rizobio debe penetrar en el pelo radical de forma que se mantenga la integridad del mismo, evitando la respuesta defensiva por parte de la planta ya que podría abortar el proceso infectivo. Por tanto, esta etapa puede considerarse crítica para el progreso de la relación simbiótica.

Aunque los factores de nodulación purificados pueden inducir por sí mismos la deformación del pelo radical y la división de las células corticales de la raíz, no se conoce todavía ninguna molécula que induzca la formación del canal de infección sin la presencia física del microorganismo (Hirsch, 1999; Oldroyd y Downie, 2008). A pesar de su importancia, el mecanismo exacto por el que los rizobios invaden los pelos de su leguminosa hospedadora todavía se desconoce. Tras distintas hipótesis formuladas previamente, varios trabajos de microscopía como los de Callaham y Torrey (1981) habían demostrado con claridad que se produce una hidrólisis puntual y localizada de la pared celular del pelo radical en el sitio de unión de la bacteria a la misma. Una vez puestos a punto por nuestro grupo de investigación diferentes métodos de detección de actividad hidrolítica de los polisacáridos que componen la pared celular vegetal (Jiménez-Zurdo *et al.*, 1996a; Mateos *et al.*, 1992), se pudo superar la barrera que suponía la detección fiable de estos enzimas por parte de los rizobios.

Rhizobium leguminosarum bv. trifolii, hospedador habitual de *Trifolium repens*, fue la especie seleccionada para este trabajo ya que es el microorganismo productor de celulasas mejor estudiado. En el grupo de investigación “Interacciones planta-microorganismo” del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca se ha comprobado que la cepa ANU843 produce una celulasa (CelC2) que aplicada de forma exógena puede hidrolizar de forma muy localizada y específica la punta del pelo radical de su planta homóloga *Trifolium repens*, lo que se ha descrito como fenotipo Hot (Hole on the Tip) (Mateos *et al.*, 2001). Tras purificar la celulasa CelC2, se confirmó que se trata de un isoenzima con actividad 1,4- β -endoglucanasa (EC 3.2.1.4) perteneciente a la familia 8 de las glicosil hidrolasas (Coutinho y Henrissat, 1999).

A partir de estos resultados previos, en este trabajo se ha llevado a cabo la **caracterización molecular** de la celulasa CelC2. Para ello, se ha localizado el gen que codifica para el enzima responsable de su actividad, se ha secuenciado, determinando los dominios que lo conforman, y se ha explorado el grado de conservación y las relaciones filogenéticas de este gen dentro del género *Rhizobium*. Los resultados obtenidos revelaron que este enzima presenta una serie de características que le convierten en una molécula posiblemente clave en el proceso de infección de la bacteria en su hospedador:

- En primer lugar, su localización: según los estudios previos, la celulasa CelC2 se encuentra unida a la membrana externa de la célula (Jiménez-Zurdo *et al.*, 1996a; Martínez-Molina *et al.*, 1979; Mateos *et al.*, 1992; Mateos *et al.*, 2001). Estos datos se ven reforzados con el análisis *in silico* de su secuencia aminoacídica, ya que los estudios bioinformáticos predicen que contiene un péptido señal que indica que esta proteína es excretada al espacio periplásmico mediante el sistema de secreción general descrito en bacterias, donde puede permanecer adherida a la membrana externa. Además, estos resultados coinciden con otros publicados recientemente en los que una endoglucanasa producida por *Sinorhizobium fredii* se ha inmunolocalizado mayoritariamente en la membrana externa de la bacteria (Hu *et al.*, 2009). Estos autores además parecen demostrar que la adición de flavonoides provoca la migración de las celulasas hacia los polos de la célula. Todas estas características restringen el pequeño rango de acción de la celulasa en base al posicionamiento físico de la bacteria en la interfase con la pared celular de su hospedador.

- Por otro lado, la relativa pequeña cantidad en la que se sintetiza minimiza la hidrólisis indiscriminada y masiva de la pared que inevitablemente resultaría en la lisis y posterior muerte de la célula vegetal del hospedador. Esta característica es compartida por las celulasas producidas por todos los organismos que nodulan leguminosas, ya que en los ensayos llevados a cabo en este trabajo se ha observado que los halos de hidrólisis son de pequeño tamaño, todo lo contrario a los que producen los microorganismos patógenos. Por tanto, la regulación en la expresión de los sistemas celulolíticos en bacterias que establecen simbiosis con plantas supone una diferencia respecto a los microorganismos celulolíticos que son capaces de vivir a expensas de la celulosa, utilizándola como fuente de carbono y energía mediante la secreción de grandes cantidades de enzimas hidrolíticos de la pared celular al medio extracelular.

- Además, la especificidad de sustrato de la celulasa CelC2 por la celulosa no cristalina restringe significativamente *in vivo* el lugar donde se lleva a cabo su acción erosiva, concentrándola en aquellas zonas específicas de la raíz que carecen de una arquitectura cristalina de la pared celular vegetal. En los pelos radicales la pared celular se compone de celulosa cristalina excepto en el ápice de aquellos en desarrollo, que posee naturaleza no cristalina y es justo el sitio por donde penetra la bacteria en la planta iniciando el proceso endosimbiótico fijador de nitrógeno. Este hallazgo permite explicar uno de los eventos más significativos del proceso de infección por el cual los rizobios sólo son capaces de erosionar y penetrar por uno de los lados de la pared celular del pelo radical pese a ser atrapado en forma de sándwich por ambas partes cuando se forma el “curling” (Callaham y Torrey, 1981; Dazzo *et al.*, 1996; Fähræus, 1957; Mateos *et al.*, 2001; Napoli *et al.*, 1975; Turgeon y Bauer, 1985). Pero además, utilizando microscopía de luz polarizada hemos observado que en *Trifolium repens*, los canales de infección por los que transcurren las bacterias hasta llegar a los nódulos se encuentran recubiertos de celulosa cristalina, ya que son refráctiles a la luz polarizada. Sin embargo, en el extremo terminal del canal de infección, donde las bacterias son liberadas en las células del nódulo, la celulosa presenta una organización no cristalina, susceptible de ser hidrolizada por el enzima CelC2. Por tanto, la celulasa CelC2 puede participar en estas dos etapas claves que tienen lugar durante el establecimiento de una simbiosis fijadora de nitrógeno.

- En cuarto lugar, su universalidad, ya que los genes que codifican enzimas con actividad celulolítica están comúnmente extendidos no sólo entre los rizobios, sino además entre una gran diversidad de eubacterias de vida libre que establecen relaciones simbióticas con las plantas. Además, en este trabajo se ha llevado a cabo una actualización los estudios previos de detección de actividad celulolítica en todas las cepas tipo de microorganismos que nodulan leguminosas, comprobando que en todos los casos el resultado fue positivo. También se ha conseguido localizar homólogos al gen *celC*, que se encuentra ampliamente distribuido entre los rizobios de crecimiento rápido pertenecientes a los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, comprobando además que posee un alto grado de conservación y se localiza en el cromosoma entre las especies pertenecientes al género *Rhizobium*. Todos estos resultados refuerzan la posible implicación de la celulasa CelC2 en procesos de importancia para la supervivencia en el ecosistema de estos microorganismos.

- En quinto lugar, cabe destacar que el diámetro del agujero producido tras la erosión completa de la pared celular de la punta del pelo radical por la acción de la celulasa CelC2 purificada se encuentra precisamente dentro del rango de tamaño medido *in situ* que generan las bacterias de la cepa silvestre de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* al atravesar la pared celular vegetal durante la infección primaria de su hospedador, lo que les permitiría atravesar esta barrera física (Callaham y Torrey, 1981; Mateos *et al.*, 2001; Napoli *et al.*, 1975).

- Y por último, es importante señalar que el pH óptimo de acción de la celulasa CelC2 es compatible con el pH ligeramente ácido medido *in vivo* de la superficie externa de los pelos radicales de trébol (J. Salzwedel y F. Dazzo, datos no publicados).

Todas estas propiedades filogenéticas, bioquímicas junto con la localización y el citológicas de la celulasa CelC2 son típicas de lo que cabría esperar de un enzima producido por *Rhizobium* capaz de degradar la pared celular y que juega un papel importante contribuyendo a la creación del portal de entrada del microsimbionte durante los primeros pasos de la infección primaria, y a la liberación de las bacterias en el nódulo durante los estadios posteriores de infección secundaria, ambos imprescindibles para el progreso de la relación simbiótica fijadora de nitrógeno con su hospedador.

Para demostrar estas hipótesis y llevar a cabo la **caracterización funcional** del enzima CelC2, en este trabajo se propuso la construcción de mutantes knock-out y superproductores del gen que codifica esta proteína en *R. leguminosarum* bv. trifolii. Una vez obtenidos y caracterizados, se llevaron a cabo ensayos *in planta* con estas cepas para evaluar la verdadera implicación de esta celulasa en el proceso de infección. En la tabla 28 se resumen los principales resultados inferidos de los distintos análisis del fenotipo simbiótico de estas cepas, así como los del estudio de la cepa complementada, de *S. meliloti* 1021 y de un recombinante de *S. meliloti* que expresa de forma heteróloga la celulasa CelC2, todas ellas inoculadas en plantas de *Trifolium repens*.

Siguiendo las etapas del proceso de infección, cabe destacar en primer lugar que las plantas de trébol inoculadas con la cepa carente de la celulasa CelC2 no parecen presentar ningún defecto en las primeras etapas del **proceso de señalización**. Sin embargo, las cepas superproductoras de la celulasa CelC2 provocan una serie de defectos en la deformación de los pelos radicales (Had, Tabla 28) y también un retraso en la cinética de nodulación (Noi) y un menor número de nódulos al final de los ensayos *in vitro* al ser inoculadas en sus leguminosas compatibles (ANU843C2⁺ en *Trifolium* y 1021C2⁺ en *Medicago*). Aunque los ensayos relacionados con estas etapas tempranas del proceso de infección han sido llevados a cabo en plantas de *Medicago truncatula* donde están disponibles las construcciones necesarias para llevar a cabo estos estudios, este retraso parece deberse a la influencia negativa del exceso de celulasa sobre el patrón de los pulsos de calcio.

A su vez, las deficiencias observadas en los pulsos de calcio se ven acompañadas de una alteración significativa en la expresión de las nodulinas tempranas, especialmente después del tratamiento con la celulasa CelC2 purificada sobre los pelos radicales, en comparación con la adición únicamente de los factores de nodulación. Así, parece que la planta es capaz de detectar un exceso de celulastas bacterianas alterando las rutas relacionadas con el reconocimiento de bacterias simbióticas y la formación de los nódulos como respuesta.

Existen varias posibles explicaciones de cómo la celulasa CelC2 provoca la inhibición de los pulsos de calcio, bien de forma directa o indirecta. Por un lado, el efecto puede responder a una posible alteración de las moléculas receptoras de los factores de nodulación, que se sitúan en la punta del pelo radical, evitando que éstas lleven a cabo su función. También podría deberse a una degradación directa de los factores de nodulación, ya que su estructura es similar a

la del sustrato de la celulasa CelC2: un lípido unido a un oligosacárido que, en el caso de los factores de nodulación, son residuos de N-acetil-D-glucosamina y en el caso de la celulosa, residuos de glucosa, en ambos casos unidos por enlaces β -1,4. Sin embargo esta celulasa parece bastante específica, aunque nunca se ha probado si es capaz de romper los enlaces del oligómero de quitina.

Entre los principales efectos indirectos que la celulasa puede tener sobre los pulsos de calcio cabe destacar que es posible que los oligosacáridos productos de la hidrólisis de la celulosa puedan estar actuando como elicitores, provocando una respuesta en la planta. Esta explicación coincidiría con la observación de una respuesta defensiva manifestada mediante la producción de especies reactivas de oxígeno localizada en la punta de los pelos radicales de plantas inoculadas con la cepa ANU843C2⁺.

Tabla 28. Fenotipo simbiótico de la cepa silvestre *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843, el mutante knock-out del gen *celC* (ANU843 Δ C2), la cepa complementada (ANU843 Δ C2comp), la cepa recombinante superproductora de la celulasa CelC2 (ANU843C2⁺); la cepa silvestre *S. meliloti* 1021 y la cepa recombinante que expresa de forma heteróloga la celulasa CelC2 (1021C2⁺), inoculadas en *Trifolium repens*.

| ETAPA | FENOTIPO | CEPA | | | | | |
|---|----------|--------|--------------------|------------------------|------------------------|------|----------------------|
| | | ANU843 | ANU843 Δ C2 | ANU843 Δ C2comp | ANU843 C2 ⁺ | 1021 | 1021 C2 ⁺ |
| Señalización | Had | + | + | + | +/- | +/- | +/- |
| | Noi | + | + | + | +/- | - | - |
| Adhesión al pelo radical | Roc | + | + | + | + | + | + |
| | Roa | + | ++ | + | +/- | +/- | +/- |
| Curvatura y degradación del pelo radical | Hac | + | +/- | + | +/- | - | - |
| | Hot | + | - | + | ++ | - | + |
| Formación y desarrollo del canal de infección | Inf | + | - | + | +/- | - | - |
| Liberación en el nódulo | Bar | + | - | + | ++ | - | - |
| Fijación de N ₂ | Fix | + | - | + | +/- | - | - |

(+) el fenotipo de esta etapa ocurre de forma habitual en una simbiosis compatible, (-) ausencia total o severas deficiencias, (++) incremento del número de eventos relacionados con este fenotipo en relación a la cepa silvestre, aunque se produzca de forma aberrante, (+/-) descenso del número de eventos relacionados con este fenotipo o alteración del mismo con respecto a la inoculación de la cepa silvestre en su leguminosa compatible.

La alteración de los pulsos de Calcio tras la adición de la celulasa CelC2 purificada coincide con resultados previos que se han obtenido en ensayos de viabilidad de protoplastos, en los que se observó que tras el tratamiento con una endoglucanasa de *Trichoderma viridie*, los factores de nodulación no provocaban la despolarización de la membrana plasmática de los pelos radicales ni causaban un flujo de iones detectable, incluso después de retirarlos del medio (Carden y Felle, 2003). Estos autores además observaron que los efectos de las pectoliasas eran más fuertes que los de las celulasas y que los enzimas desnaturalizados provocaban efectos similares, por lo que concluyeron que la influencia en los pulsos de calcio no se originaba directamente por la actividad enzimática, sino por la interacción de las proteínas con la pared celular.

Continuando con las etapas del proceso de infección, con el objetivo de estudiar el papel de la celulasa CelC2 en la biosíntesis de celulosa bacteriana y completar estudios previos sobre la función de este biopolímero en la **colonización** de los pelos radicales (Roc) y la adhesión al extremo de estos por parte de los rizobios (Roa), en este trabajo también se han evaluado estos fenotipos en las cepas de estudio. Los resultados indican que la celulasa CelC2 desempeña un papel clave en la biosíntesis de celulosa modulando la longitud de las microfibrillas que se forman. Así, éstas poseen una longitud significativamente superior en el mutante ANU843 Δ C2 que en la cepa parental, mientras que no fueron detectadas en el exterior de las células de la cepa ANU843C2⁺.

En cuanto al fenotipo simbiótico, se observa que todas las cepas son capaces de colonizar la raíz (Tabla 28), lo que permite afirmar que la ausencia de celulosa no afecta a esta capacidad. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente en el grupo de Ausmees *et al.* (1999), en los que cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii defectivas en la producción de celulosa por mutación de los genes *celA* o *celB* son capaces de colonizar y establecer simbiosis efectivas en raíces de trébol en condiciones de laboratorio. Por tanto, la producción de microfibrillas de celulosa no parece ser esencial para la adhesión de la bacteria a la planta ni para su posterior entrada ya que probablemente, en las condiciones controladas en las que se llevan a cabo estos ensayos, puede que la presencia tanto de ricadhesinas como de lectinas, capaces también de mediar la unión de los microsimbiontes a la planta, sean suficientes para garantizar su adhesión.

Sin embargo, el beneficio que los rizobios obtienen gracias a estas microfibrillas de celulosa en la colonización no sólo de la punta del pelo radical, sino también de la epidermis de la raíz y de las partículas del suelo, probablemente tenga mayor importancia simbiótica en condiciones naturales. En la rizosfera, la capacidad de formar estos agregados podría evitarles ser desplazados de sus nichos ecológicos y facilitar la competición por el acceso a la superficie de la raíz frente a la presión selectiva de otras bacterias y organismos eucariotas. Además, este polisacárido se induce en contacto con las raíces de trébol (Ausmees *et al.*, 1999) y estudios más recientes llevados a cabo con cepas de la especie *R. leguminosarum* bv. viciae en otras leguminosas muestran que su biosíntesis podría ser necesaria para la infección óptima y la formación de agregados tridimensionales o biopelículas, especialmente en los pelos más alargados de la raíz (Laus *et al.*, 2005b; Williams *et al.*, 2008), como se discutirá más adelante.

Una observación con más detalle de la capacidad de las cepas ANU843 Δ C2 y ANU843C2⁺ de unirse y formar la estructura conocida como “cap” en la punta de los pelos radicales (Roa), nos permitió comprobar cómo la presencia de microfibrillas de celulosa de mayor longitud favorece la formación de agregados que en ocasiones son de mayor tamaño o más compactos que los que se observan en la cepa silvestre. Por otro lado, en ausencia de microfibrillas de celulosa sólo se observa la adhesión a la punta del pelo radical de células individuales. Así, se puede afirmar que la celulosa sintetizada por *Rhizobium* interviene en la formación y mantenimiento de las estructuras tridimensionales que componen los agregados bacterianos, es decir, en la adhesión bacteria-bacteria, no siendo necesaria en la unión bacteria-planta.

Estos resultados indicarían que la celulosa bacteriana sí es necesaria para una correcta formación de los agregados bacterianos conocidos como “cap” en la punta de los pelos radicales. No obstante, esta etapa tampoco es fundamental para el progreso de la relación simbiótica, ya que se observa que la cepa deficiente en la formación del “cap” (ANU843C2⁺), es capaz de infectar intracelularmente trébol a través de los pelos radicales. Este hecho confirma que la adhesión de al menos células individuales a la punta del pelo radical es condición suficiente para que se produzcan las etapas consecutivas del proceso de infección, y que en este proceso la celulosa sólo intervendría en la última etapa de unión fuerte e irreversible a la punta del pelo tal y como se confirma en este trabajo y como se ha sugerido previamente en otros estudios (Mateos *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 2008).

Por otro lado, una mayor producción de celulosa, como la que se ha observado en la cepa ANU843 Δ C2, tampoco parece que pueda afectar significativamente a las etapas posteriores del proceso, ya que cepas superproductoras de celulosa por mutación de genes reguladores del operón *celABC* también mostraron la capacidad de nodular e infectar trébol con normalidad (Ausmees *et al.*, 1999). Por tanto, podemos afirmar que los fenotipos subsiguientes relativos a la infección intracelular de la planta no se verán afectados de forma significativa por las diferencias observadas en la capacidad de sintetizar celulosa bacteriana por parte de las cepas de estudio, sino que previsiblemente serán consecuencia del papel de la endoglucanasa CelC2 en la degradación de la pared celular vegetal.

En relación a la etapa consecutiva a la adhesión a los pelos radicales, es decir, la **curvatura del pelo radical** (Hac), cabe destacar que este fenotipo se observa tanto en las plantas inoculadas con la cepa knock-out como con la cepa superproductora de la celulasa CelC2. Sin embargo, hay que hacer una serie de consideraciones. En primer lugar, cabe destacar que la cepa ANU843 Δ C2 induce deformaciones en la punta de los pelos radicales que no suelen finalizar en la formación del “curling” completo. El modo en que la celulasa CelC2 podría estar implicada en la formación del cayado de pastor completo es todavía desconocido.

Sin embargo, una de las posibles formas de explicar que la ausencia de este enzima evite la deformación completa que da lugar al plegamiento del pelo sobre sí mismo formando el cayado de pastor podría ser que, una vez que el extremo apical ha comenzado a ser degradado por una bacteria capaz de sintetizar

el enzima CelC2 de forma natural adherida al pelo radical, éste respondiera desarrollando el “curling” completo. De esta forma, la planta evitaría que se produjera la extrusión del citoplasma al exterior de la célula, como ocurre transcurridas unas 5 horas tras la adición del enzima purificado sobre raíces de trébol.

Esta hipótesis se ve reforzada con el fenotipo que se observa tras la inoculación con la cepa de *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843 superproductora de la celulasa CelC2 en plantas de trébol. En ellas, los fenotipos predominantes fueron aberrantes en la deformación e **infección primaria** de los pelos radicales, pudiendo observar que la punta de algunos pelos radicales en crecimiento se encuentra claramente degradada o ha sufrido una hidrólisis que ha derivado en una o varias ramificaciones del pelo radical. Estos pelos erosionados no suelen recuperar la capacidad de formar un “curling” y ser infectados de forma habitual. Sin embargo, en algunos pelos sí se forman canales de infección que progresan hasta los nódulos. Este hecho puede deberse a que en estos casos el pelo radical haya respondido rápidamente a la acción hidrolítica de la celulasa, curvándose para proseguir con la relación simbiótica antes de que sea inviable para ello debido al orificio originado en su extremo.

Por otro lado, en este trabajo se comprueba cómo, debido a la ausencia de la celulasa CelC2, los mutantes ANU843 Δ C2 son incapaces de romper la pared celular vegetal en la punta del pelo radical, abortándose en este punto el proceso de infección canónico. Así, tampoco se forman los canales de infección que son necesarios para invadir los nódulos, abortando el proceso simbiótico por esta vía lo que provoca que el mutante sea prácticamente incapaz de llevar a cabo la fijación de nitrógeno. La ausencia de canales de infección en los pelos radicales de las plantas inoculadas con el mutante knock-out, no nos ha permitido obtener más resultados sobre la implicación directa de la celulasa CelC2 en las posteriores etapas del proceso de infección utilizando esta cepa.

Sin embargo, también se observa como el mutante defectivo en la celulasa CelC2 conserva la capacidad de invasión a través de espacios intercelulares o de grietas en la planta. Tal y como se describe en el apartado 4.2 de la introducción, existen tres mecanismos de entrada de la bacteria en la planta y cada uno posee unos requerimientos específicos en cuanto a la intervención de los factores de nodulación (Madsen *et al.*, 2010). En cuanto al requerimiento de la celulasa CelC2, gracias a la obtención de este mutante knock-out se observa como al bloquearse uno de estos mecanismos de entrada (intracelular por pelos radicales) se mantiene el modo de entrada intercelular y posterior invasión del nódulo sin formación del canal de infección y la penetración en la planta mediante grietas (crack). Esto confirma que *R. leguminosarum* bv. trifolii utiliza los tres mecanismos descritos en *Lotus* y que los dos que no implican la infección a través del pelo radical, son independientes de la celulasa CelC2.

Cabe destacar que la obtención de la cepa ANU843 Δ C2comp, resultante de la complementación de la cepa knock-out de forma que se restaura su habilidad de producir la celulasa CelC2, y la confirmación de que es capaz de infectar los pelos radicales e inducir nódulos eficientes fijadores de nitrógeno en plantas de

trébol de forma similar a la cepa silvestre, proporciona más evidencias de la importancia de este enzima en el éxito de la simbiosis *Rhizobium*-trébol. Así, todos estos datos parecen confirmar nuestra hipótesis en relación a las tres propiedades simbióticas principales consistente en que, así como la capacidad de una bacteria de inducir la formación de nódulos viene determinada por los genes *nod* y la efectividad viene determinada por los genes *fix*, la infectividad vendría determinada por los genes *celC*.

Esta hipótesis a su vez cobra más fuerza con los resultados expuestos en esta memoria en relación a las propiedades simbióticas inferidas al introducir el gen *celC* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, que es crucial para la infectividad en trébol, en la cepa 1021 de *Sinorhizobium meliloti* que no posee homólogos a este gen y es incapaz de inducir la formación de nódulos e infectar plantas de *Trifolium repens*. Los ensayos de infección llevados a cabo en esta leguminosa muestran que se rompe una de las barreras de especificidad, consiguiendo que esta cepa de *S. meliloti* solamente expresando de forma heteróloga el gen *celC* sea capaz de degradar la punta del pelo radical e invadir una leguminosa no compatible. Sin embargo, no se produce la subsiguiente formación de canales de infección y por tanto se aborta el proceso de entrada. La ausencia de factores de nodulación compatibles supone una barrera insuperable en este proceso, especialmente para que se lleve a cabo la formación de los nódulos, pero probablemente también para el desarrollo de los canales de infección. Todos estos datos abren un nuevo abanico de posibilidades para estudiar en el futuro el papel del enzima *celC* en la infección de otras plantas tanto leguminosas como no leguminosas.

Continuando con la etapa de formación y **desarrollo del canal de infección** (Inf), estudios de microscopía muestran cómo esta infección intracelular de los rizobios en su leguminosa huésped comienza cuando las bacterias quedan atrapadas entre las paredes celulares adyacentes del pelo radical de distinta composición: por un lado celulosa cristalina en el axis del pelo radical y por otro lado celulosa no cristalina del extremo apical en crecimiento. Según nuestros resultados, esta microcolonia una vez confinada generaría, no sólo una alta concentración local de factores de nodulación, sino también de celulasas hasta alcanzar la cantidad necesaria para llegar a una concentración que permita la degradación localizada de la pared celular en el extremo apical del pelo radical, generando un punto de intrusión (Figura 106). Al mismo tiempo, el continuo crecimiento y la división de las bacterias atrapadas originarían una presión interna para contrarrestar la turgencia de la célula vegetal, evitando la extrusión del citoplasma. Este hecho también explicaría por qué la existencia de células bacterianas vivas atrapadas en el cayado de pastor son el requisito indispensable para el inicio de la formación del canal de infección (Gage y Margolin, 2000).

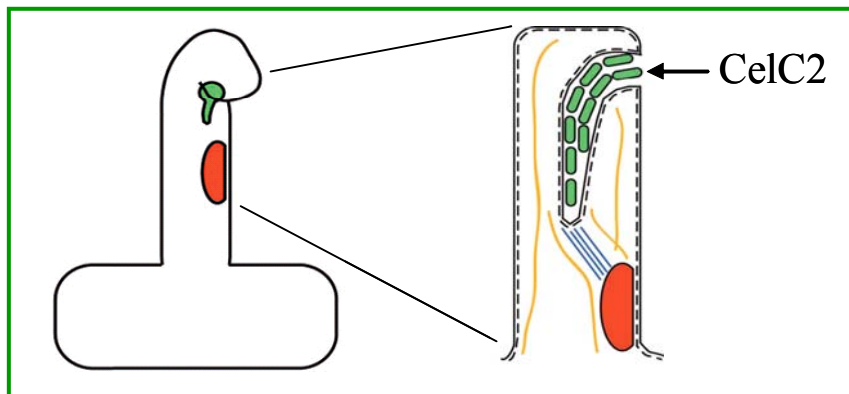


Figura 106. Representación esquemática del modo de acción de la celulasa CelC2 durante la etapa de degradación de la punta de un pelo radical tras la formación del cayado de pastor y la progresión del canal de infección. En verde están representados los microorganismos, la pared celular y la membrana plasmática vegetal se muestran en negro mediante una línea continua y discontinua respectivamente. En amarillo se muestran los filamentos de actina y en azul los microtúbulos, que se localizan entre la zona de avance del canal de infección y el núcleo de la célula vegetal. Adaptado de Gage (2004).

Pese a que todavía no está claro cuáles son los mecanismos exactos por los que se inicia este cordón de infección en los pelos radicales de la planta durante una simbiosis compatible, varias moléculas producidas tanto por parte de la planta como de la bacteria que intervienen en el proceso han sido previamente identificados como resultado de análisis genéticos y citológicos (Brewin, 2004; Downie, 2010). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran cómo además uno de estos elementos, la producción de celulasas que median la rotura de la pared celular vegetal en la punta del pelo radical, debe estar estrictamente regulado a fin de generar una infección intracelular a través de canales de infección, ya que tanto la ausencia como el exceso de actividad de la enzima CelC2 bloquean el inicio de la infección.

Una vez iniciado el canal de infección, éste debe progresar hasta las células del nódulo (Figura 106). Los pelos radicales y los tubos polínicos son los ejemplos mejor estudiados de células vegetales que sufren un proceso de elongación apical. El crecimiento polar durante la fase de alargamiento se produce por una pérdida de turgencia o relajación de los componentes de la pared celular en zonas específicas que se encuentra en crecimiento, como la punta del pelo radical. De esta manera, su elongación se limita sólo al extremo terminal, y la pared celular situada en los flancos del pelo se refuerza para evitar la expansión (Knight, 2007).

Por su parte, los canales de infección que comienzan en el interior de los pelos radicales también sufren un proceso de crecimiento apical, por ello se ha propuesto que el proceso de elongación de estas estructuras se produce mediante alguno de los mecanismos involucrados en el crecimiento de los pelos radicales antes de ser infectados (Gage, 2004). Por otro lado, en el extremo del canal de infección en desarrollo también se produce la biosíntesis de nueva pared y membrana celular, por tanto, realmente parece posible que esta estructura sea generada por el crecimiento de los pelos radicales de forma invertida respecto al que se produce normalmente en el ápice de estas células cuando no han sido

infectados, resultando en la reorganización de la polaridad celular (Gage, 2004) y en la presencia de celulosa de estructura no cristalina en la zona en crecimiento.

En este trabajo, mediante microscopía electrónica de transmisión se pudo observar cómo una vez en el interior de las raíces de trébol, la cepa superproductora de la celulasa CelC2 es capaz de formar canales de infección a lo largo de los cuales aparentemente presenta el mismo comportamiento que la cepa silvestre ANU843, probablemente debido a la composición cristalina de la pared. La procedencia de estos canales puede ser únicamente de aquellos pelos que sí son infectados mediante la formación del curling y posteriormente del canal de infección en el pelo radical, aunque es posible que, en algunos casos, la infección masiva de los pelos radicales desemboque en la formación de canales de infección en la base del pelo radical como ocurre tras la infección de las bacterias mediante “cracks” o espacios intercelulares.

Posteriormente, cuando las bacterias alcanzan la zona de infección, deben ser internalizadas por las células corticales para establecer un nicho en su interior. Estas células vegetales albergarán las células bacterianas que se liberan en un compartimiento individual (fenotipo Bar), compuesto por una membrana pero carente de pared celular, que se origina a partir del canal de infección. Una vez que las bacterias quedan envueltas dentro de las membranas de la célula huésped, deben ser capaces de sobrevivir en el interior de los simbiosomas y diferenciarse en la forma fijadora de nitrógeno conocida como bacteroide.

El examen detallado de la estructura de las zonas donde **las bacterias son liberadas del canal de infección** muestra que en este punto donde se produce la liberación, las células carecen de pared celular (Jones *et al.*, 2007; Subba-Rao *et al.*, 1995). Estos resultados se corroboran en este trabajo utilizando microscopía de luz polarizada, que nos ha permitido observar que estas zonas no son refráctiles y, por tanto, carecen de celulosa de composición cristalina. Sin embargo, todavía se desconoce si la infección secundaria es originada bien por la detención de la síntesis de la pared celular durante la elongación intracelular del canal de infección o por una degradación local provocada por la síntesis de enzimas hidrolíticos de la pared celular, que podrían a su vez tener un origen bacteriano o vegetal.

Los estudios de microscopía electrónica de transmisión llevados a cabo en este trabajo muestran como la zona donde se forma la gota de invasión una vez alcanzadas las células del nódulo se encuentra altamente hidrolizada por la cepa superproductora de la celulasa CelC2, provocando la pérdida de turgencia de la pared celular en el final del canal de infección, donde la estructura es no cristalina y, por tanto, susceptible de la acción de esta celulasa. Así, esta débil estructura en ocasiones no puede mantener la presión del lumen del canal de infección, que se ensancha visiblemente hasta que literalmente explota. Como consecuencia, las bacterias son liberadas al interior de las células del nódulo de forma “desnuda”, sin rodearse de la membrana peribacteroidea.

Estas bacterias de la cepa ANU843C⁺ que se liberan al citoplasma sin rodearse de la membrana plasmática no pueden completar su diferenciación en bacteroides ni expresar las enzimas del complejo nitrogenasa y, por tanto, son incapaces de llevar a cabo la **fijación de nitrógeno**. Además, parece que la

presencia de bacterias “desnudas”, hecho poco frecuente en el interior del nódulo, induce una senescencia prematura de estas estructuras bien por la sola presencia de bacterias que no pueden llevar a cabo su función y, por tanto, son innecesarias para la planta o bien porque estas bacterias continúan produciendo celulasas que entran en contacto directo con la célula vegetal provocando su desorganización.

Estos resultados refuerzan el papel crucial de la celulasa CelC2 en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa ya que sugieren que este enzima puede estar implicado en la infección secundaria, es decir, en la liberación de las bacterias desde el canal de infección para formar los simbiosomas. Sin embargo, la incapacidad del mutante knock-out de la celulasa CelC2 de llegar hasta estas zonas de liberación y así poder comprobar su comportamiento, harían necesarias otras técnicas como la hibridación *in situ* utilizando anticuerpos específicos para la celulasa CelC2 que permitan comprobar si efectivamente ésta se localiza en estos puntos de liberación.

Por tanto, existen dos barreras físicas de defensa en las plantas: la pared celular vegetal (en contacto directo con los microorganismos que se encuentran en el exterior) y la membrana celular (en contacto con el interior de la pared celular) y una simbiosis efectiva debe mantener al menos la integridad de la membrana celular a través de los canales de infección, ya que una hidrólisis excesiva de la pared celular puede provocar la pérdida de turgencia y la destrucción de la membrana celular por la presión que se genera. Así, durante la infección primaria, el orificio practicado por la celulasa CelC2 en la punta de la raíz del pelo radical conduce a la extrusión de una parte del protoplasto. Sin embargo, durante la liberación de las bacterias del canal de infección (infección secundaria), la hidrólisis indiscriminada de la zona no cristalina de la pared celular bacteriana provoca la "intrusión" en las células del nódulo. Ambos efectos provocan la interrupción del proceso de infección: el primero, al evitar la formación de canales de infección funcionales y el segundo por una senescencia prematura de los nódulos.

Todas estas observaciones microscópicas se ven apoyadas por los efectos fenotípicos que presentan los mutantes superproductores de la celulasa CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii, aberrantes en el desarrollo nodular y de las plantas en ausencia de nitrógeno. Esto se debe a una ruptura en el balance entre biosíntesis e hidrólisis de la pared celular vegetal de *Trifolium repens* que provoca, en ausencia de nitrógeno, una severa disminución del crecimiento y desarrollo de las plantas. Por tanto, este comportamiento rompe el proceso simbiótico dando lugar a la formación de nódulos invadidos pero en algunos casos inefectivos.

Sin embargo, también se observa la presencia de simbiosomas en algunos nódulos efectivos en plantas inoculadas con la cepa ANU843C2⁺. Este hecho podría ser debido a la respuesta de la planta a una mayor cantidad de celulasas producida por el mutante, por ejemplo con un engrosamiento de la pared celular que permita la liberación de las células de forma correcta. Otra posible explicación sería la pérdida del plásmido que les confiere capacidad para sobreexpresar la celulasa CelC2 en algunas células bacterianas, ya que una vez inoculadas carecen de presión selectiva por parte del antibiótico. Posteriormente,

estas células revertientes podrían ser seleccionadas positivamente por parte de la planta, tal y como si de un cambio adaptativo que favorece la simbiosis se tratara.

Recientemente se ha observado que las leguminosas son capaces de ejercer una fuerte presión a la hora de seleccionar bacterias eficientes simbióticamente, incluso se ha descrito que tras la adición de cepas de *Ralstonia solanacearum* portadoras del plásmido simbiótico, la planta es capaz de seleccionar aquellas que presentan mutaciones en los genes responsables del sistema de secreción III, y por tanto de la mayor parte de los factores que determinan su virulencia (Marchetti *et al.*, 2010). Curiosamente, estos “patógenos”, inducen la formación de nódulos similares a los que genera la cepa ANU843C2⁺: irregulares, parcialmente infectados y con bacterias que no forman simbiosomas, lo cual también genera una necrosis prematura del nódulo (Marchetti *et al.*, 2010) y previsiblemente siguen manteniendo la expresión de genes que codifican endoglucanasas como el *egl*, que está implicado en su virulencia (Roberts *et al.*, 1988).

Por otro lado, la sobreexpresión del gen *celC* conlleva un aumento de la capacidad de invadir los nódulos de trébol por parte de la cepa *R. leguminosarum* bv. trifolii ANU843, probablemente a través de canales de infección pero quizá también derivado de los eventos en los que se producen infecciones masivas a través de los pelos o incluso entre espacios epidérmicos. Sin embargo, esta cepa induce un mayor estrés oxidativo en la planta, lo cual sugiere que la regulación de la expresión del gen *celC* es importante para el establecimiento de una relación efectiva entre ambos simbiosomas. Carden y Felle (2003) también observaron que la detección simultánea de enzimas hidrolíticas de la pared celular vegetal por parte de la planta no sólo provoca alteraciones en el proceso de infección por inhibir la respuesta de la raíz frente a los factores de nodulación, sino que además el tratamiento con estas enzimas activa mecanismos de defensa en la planta.

Sin embargo, esta respuesta de la planta solo se localiza en aquellas estructuras donde la celulosa posee una composición no cristalina y por tanto son el sustrato de la celulasa CelC2 y, además, no se ha detectado un incremento en la producción de ácido salicílico. Esto puede ser debido al mimetismo de la celulasa CelC2, que no es reconocida como un agente capaz de desencadenar una mayor respuesta defensiva en la planta no sólo porque la bacteria esté simultáneamente sintetizando los factores de nodulación sino también porque el hecho de que esta celulasa intervenga en la síntesis de celulosa de forma similar a la celulasa vegetal Korrigan, puede prevenir la activación de los mecanismos de defensa de la planta.

Por otro lado, con el objetivo de conocer mejor la **especificidad** de esta celulasa, en este trabajo también se ha diseñado un ensayo en otro sistema simbiótico conocido, el sistema *Sinorhizobium-Medicago*. Estudios previos sobre la especificidad de las celulasas muestran que *R. leguminosarum* bv. trifolii apenas produce pequeñas hendiduras que siguen el contorno de la célula bacteriana conocidas como “pits” en la superficie de la raíz y los pelos radicales de alfalfa y sí produce muchos en trébol mientras que se observa el efecto contrario en *S. meliloti* (Mateos *et al.*, 2001). Por otro lado, una vez purificada la celulasa CelC2 se comprobó que en las condiciones en las que era capaz de formar un agujero en la punta de los pelos radicales de trébol, este fenotipo no se observaba en la punta de los pelos radicales de alfalfa. Todos estos resultados

apuntaban hacia que las celulasas rizobianas poseen una cierta especificidad de hospedador.

Sin embargo, en este trabajo hemos observado que el enzima CelC2 actúa de manera similar en el sistema simbiótico *Sinorhizobium-Medicago* como en *Rhizobium-Trifolium* cuando se produce una sobreexpresión del mismo, es decir, degrada la punta de algunos pelos radicales y el final del canal de infección, manteniendo inalteradas el resto de estructuras y ocasionando la aparición de un mayor número de nódulos inefectivos en la fijación de nitrógeno. Así, los nódulos de las plantas de alfalfa inoculadas con *S. meliloti* 1021C2⁺ muestran una morfología aberrante especialmente en la zona de desarrollo nodular y presentan estructuras celulares desorganizadas en su interior en las que los rizobios parecen no estar rodeados por la membrana peribacterioide. Estos resultados muestran que los puntos de degradación de la pared celular de la celulasa CelC2 se distribuyen de forma muy localizada en las plantas de *Medicago sativa* y coinciden con la distribución restringida observada en *Trifolium repens*: las zonas isotrópicas no cristalinas en el ápice de los pelos radicales y las zonas de liberación del canal de infección.

Según nuestro conocimiento, este trabajo constituye la primera evidencia directa de la implicación de una celulasa en el proceso de infección de un microorganismo endosimbiótico fijador de nitrógeno en plantas. En la mayoría de las bacterias y hongos celulolíticos (*Trichoderma reesei*, *Clostridium thermocellum*...), la hidrólisis de la celulosa mediante complejos enzimáticos constituye una de sus fuentes de energía. Sin embargo, también se ha descrito que esta capacidad en ocasiones constituye un factor determinante en la interacción entre otros microorganismos y sus plantas hospedadoras.

Entre las bacterias y hongos fitopatógenos, la producción de enzimas hidrolíticos de la pared celular vegetal se encuentra ampliamente distribuida y caracterizada como uno de los factores que se encuentran implicados en los procesos de infección y aparición de síntomas en la planta. Así, se ha descrito que genes que codifican endoglucanasas como el *egl* de *Ralstonia solanacearum* (anteriormente *Pseudomonas solanacearum*) (Roberts *et al.*, 1988) o el *celV* de *Erwinia carotovora* (Walker *et al.*, 1994) están implicados en su virulencia.

Menos caracterizada se encuentra la producción de enzimas celulolíticos por parte de bacterias no patógenas que establecen otras asociaciones endofíticas diazotrofas, aunque existen evidencias de su implicación en procesos de colonización de la raíz. *Azoarcus* sp., una bacteria endófito de algunas gramíneas como el arroz, produce en bajos niveles de expresión una endoglucanasa (EglA) asociada a la célula. Mutantes defectivos en este gen mostraron una reducción significativa de la colonización intracelular de la epidermis de la raíz respecto a la cepa silvestre, que fue parcialmente restituida cuando se complementó, demostrando que esta endoglucanasa es un determinante importante para que se produzca una colonización endofítica satisfactoria (Reinhold-Hurek *et al.*, 2006).

Nuestros resultados sugieren un rol similar en *Rhizobium* para la infección primaria, sin embargo, pese a que la celulasa EglA muestra cierta identidad con

endoglucanasas de algunos rizobios como *Sinorhizobium meliloti* y *Azorhizobium caulinodans*, no existen evidencias de su implicación en la infección endosimbiótica. Así, mutantes defectivos o superproductores del gen *egl* en la cepa ORS571 de *Azorhizobium caulinodans* no mostraron diferencias significativas respecto a la cepa silvestre en la nodulación de su hospedador *Sesbania rostrata* bajo condiciones de laboratorio (Geelen *et al.*, 1995). Tampoco la expresión de una celulasa de la familia 5 de las glicosil hidrolasas de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* en *Sinorhizobium fredii* supuso ningún defecto en el proceso de infección y nodulación en caupí (Krishnan y Pueppkea, 1994), aunque se observó que los niveles de expresión en el nódulo eran bajos.

Sin embargo, el gen *celC* parece particularmente importante para el desarrollo de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa ya que el microorganismo requiere su actividad para establecer una asociación endosimbiótica capaz de fijar nitrógeno con su hospedador. Por tanto, este trabajo constituye un paso decisivo con respecto a las interacciones microbio-planta, ya que la capacidad de sintetizar celulasas es un fenotipo que comparten tanto patógenos como simbioses y los resultados obtenidos muestran claramente que una de las principales diferencias entre una bacteria beneficiosa endofítica o endosimbionte y un invasor perjudicial, es en realidad la intensidad de la degradación de la celulosa y la precisa localización de la acción celulolítica. Por tanto, la producción de celulasas constituye la herramienta cuidadosamente utilizada por las bacterias simbióticas para abrir delicadamente la vía de entrada en la planta huésped.

A su vez, mediante la obtención de mutantes defectivos y superproductores de la celulasa CelC2 de la cepa ANU843 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, no sólo comprobamos que esta celulasa es esencial para que se produzca la infección primaria y secundaria de *Trifolium repens* sino que además, estas cepas recombinantes obtenidas han resultado una herramienta muy válida para la determinación del papel de la celulasa CelC2 en la biosíntesis de celulosa bacteriana y en la formación de biofilms.

La celulosa es el biopolímero más abundante en la Tierra estimándose en 10¹¹ toneladas su producción anual. Además de su abundancia, este polímero es importante no sólo en agricultura (la celulosa representa el 20-30% del peso seco de la pared celular vegetal y es la molécula más abundante de ella) sino también en la industria maderera, papelera, textil y química. Son muchos y variados los seres vivos capaces de sintetizar celulosa, este proceso lo llevan a cabo tanto procariontes como eucariontes donde se incluyen animales, algas, hongos, plantas vasculares, angiospermas y gimnospermas.

Probablemente **la síntesis de celulosa** es uno de los procesos bioquímicos más importantes que peor se conoce a nivel molecular debido a su complejidad y gran regulación. La producción de celulosa en las bacterias presenta un interés añadido por su potencial económico debido a su impacto en campos como la medicina, por los problemas que supone la firme adhesión por parte de los organismos patógenos tanto en las superficies abióticas como sobre los tejidos celulares de los organismos hospedadores; pero también en otras áreas como la industria papelera y alimentaria (Romling, 2002).

Además, actualmente el descubrimiento de la capacidad de sintetizar celulosa por parte de una amplia variedad de bacterias ha incrementado las posibilidades de mejorar el conocimiento de estos procesos, ya que aún se desconoce cómo se lleva a cabo su regulación y cuáles son los mecanismos moleculares que rigen la biosíntesis de la celulosa. Paralelamente, la descripción de estos mecanismos está abriendo un nuevo abanico de posibilidades para conocer cuál es el papel de la celulosa en la adhesión de las bacterias a distintos sustratos y cómo se lleva a cabo la formación de biopelículas durante su interacción tanto con el medio ambiente, incluidos sus posibles hospedadores, bien con el objetivo de favorecerlas en caso de que sean beneficiosas o luchar contra su formación para evitar la colonización masiva de microorganismos patógenos.

Curiosamente el Rojo Congo, uno de los colorantes que tiene afinidad por la celulosa, era utilizado como marcador para aislar colonias rizobianas en muestras de suelos, ya que se había descrito su débil afinidad por este colorante en comparación con otras especies de microorganismos que habitan en este medio, incluyendo las del género próximo *Agrobacterium*, que presentaban una gran afinidad (Vincent, 1970). Sin embargo, estudios posteriores con distintas especies de rizobios demostraron que, aunque existía cierta variabilidad entre las distintas cepas y que la absorción de este colorante varía según las condiciones de crecimiento, los rizobios sí eran capaces de absorber el Rojo Congo, y por tanto, este fenotipo no podía usarse como un patrón para estos estudios (Kneen y Larue, 1983; Zevenhuizen *et al.*, 1986).

Los resultados presentados en esta memoria en relación a los ensayos de afinidad por el Rojo Congo coinciden en señalar la alta variabilidad en la coloración de las distintas cepas rizobianas y la tendencia general que apuntaban Kneen y Larue en 1986 hacia una mayor coloración por parte de las especies pertenecientes a *R. leguminosarum* y *A. tumefaciens*, y una menor por parte de las especie *R. meliloti* (actualmente *E. meliloti*) y *R. japonicum* (actualmente *B. japonicum*). Sin embargo, este estudio abarca a todas las especies de microorganismos capaces de nodular leguminosas que se conocen en la actualidad, pudiendo afirmar que todas ellas son capaces de sintetizar sustancias que se unen a este colorante.

La afinidad por el Rojo Congo también varía notablemente entre las cepas modificadas genéticamente obtenidas en este estudio. Así, la cepa ANU843ΔC2 se tiñe de forma muy intensa mientras por su parte, la cepa superproductora de la celulasa CelC2 mostró una afinidad nula por este colorante. Está descrito que el Rojo Congo es capaz de unirse también a proteínas externas de membrana en otras bacterias (Theisen *et al.*, 1993), y se ha propuesto que en *Rhizobium* también puede unir β-D-glucanos (Kneen y Larue, 1983). Sin embargo, la tinción con este colorante se puede relacionar directamente con el contenido en celulosa en los cultivos bacterianos como han propuesto otros autores (Ausmees *et al.*, 1999; Zevenhuizen *et al.*, 1986) ya que los resultados obtenidos al analizar mutantes superproductores de celulasa, y comprobar mediante tinción con Calcoflúor que no producen microfibrillas externas de celulosa, parecen confirmar que *Rhizobium* no produce otras sustancias que se unan significativamente al Rojo Congo a parte de este biopolímero.

Por otro lado, la detección de la biosíntesis de celulosa *in vivo* en los rizobios se apoya con los estudios llevados a cabo *in silico* en los que se ha encontrado que existe un alto grado de conservación de las proteínas codificadas por los genes del operón *celABC* de biosíntesis de celulosa dentro de las especies del género *Rhizobium*, en contraposición a la elevada divergencia entre las regiones adyacentes. Por otro lado, todos los genomas disponibles actualmente de organismos de la familia *Rhizobiaceae* poseen genes que codifican para celulosa sintetasas, pertenecientes a las glicosiltransferasas, asociados a una proteína con función hipotética o desconocida y a una endoglucanasa. Estos genes que comparten la organización del operón *celABC* posiblemente sean los responsables de la biosíntesis de celulosa en este grupo de bacterias. Todos estos datos parecen apoyar la importancia de este polímero en la supervivencia de estas bacterias en el medio ambiente.

Como ya se ha señalado, este operón de biosíntesis de la celulosa bacteriana fue localizado en la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* R200 por el grupo de Ausmees *et al.* en 1999. Para ello, llevaron a cabo una mutagénesis con Tn5 de esta cepa y seleccionaron los posibles mutantes en biosíntesis de celulosa mediante pruebas de afinidad por el Calcoflúor y el Rojo Congo en placa, buscando aquellos con una menor capacidad de sintetizar este biopolímero. Así, obtuvieron los mutantes defectivos en la biosíntesis de los genes *celA*, *celB* y *celE*, pero no encontraron ninguna cepa con un transposón en el gen *celC*. Nuestros resultados permiten asegurar que estos autores no hubieran sido capaces de localizar el mutante *celC* debido a su método de selección, ya que dicha cepa es en realidad un superproductor de celulosa.

Este aumento y disminución de las cantidades de celulosa, respectivamente, según lo revelado por los ensayos llevados a cabo en este trabajo en los mutantes de la celulasa CelC2 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, parece confirmar que esta celulasa se encuentra directamente implicada en el mecanismos de biosíntesis de celulosa. En estudios previos, se han descrito las proteínas implicadas directamente en este proceso: CesA y Korrigan en plantas y CelA y CelC en bacterias (Figura 107). CesA y CelA poseen homología con glicosil transferasas mientras que Korrigan y CelC presentan homologías con endoglucanasas.

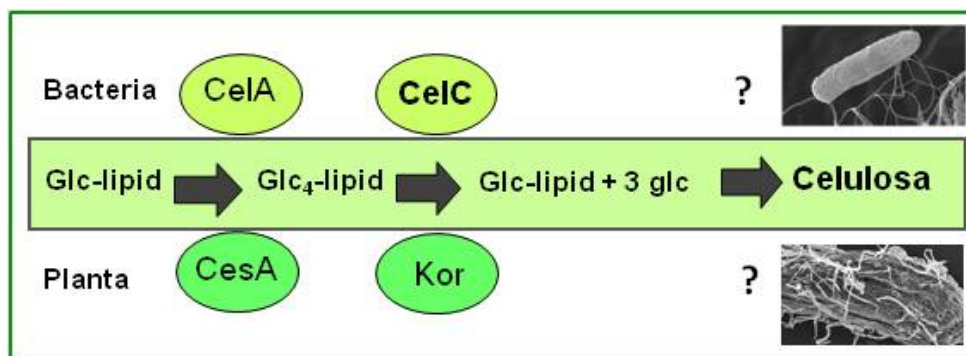


Figura 107. Ruta biosintética de celulosa vegetal (Peng *et al.*, 2002) y bacteriana (propuesta en este trabajo). Elaboración propia.

Según el modelo descrito para la biosíntesis de celulosa en plantas (Peng *et al.*, 2002), la proteína CesA cataliza la elongación de la cadena β -1,4-glucano mediante la transferencia de residuos de UDP-glucosa al intermediario sitosterol- β -sitosterol-glucosa, formando unos compuestos intermediarios en la biosíntesis de celulosa denominados celodextrinas. La otra proteína que ha sido propuesta para participar en este proceso denominada Korrigan (Kor), parece intervenir en la liberación del β -sitosterol-glucósido de la cadena de celulosa que se está formando. Sin embargo, aún se desconoce cuál es el paso intermedio por el cual se forma finalmente el polímero de celulosa y qué molécula/s intervienen en este proceso (Figura 107).

Uno de los modelos propuestos para la biosíntesis de celulosa en bacterias ha sido descrito en la cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens* por Matthyse *et al.* (1995). Estos autores coinciden en asignar al operón *celABC* esta función y proponen que el enzima CelA actúa añadiendo restos de glucosa al intermediario lípido-glucosa para formar el compuesto lípido-glucosa_x (x= 2-4 glucosas). La celulasa codificada por el gen *celC*, actuaría en este caso como una transferasa en lugar de como una endoglucanasa, ya que según estos autores se encargaría de trasladar los restos de glucosa desde el lipooligosacárido a la cadena del polímero de celulosa que se está formando. La posible función de la proteína CelB codificada por el operón es desconocida.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, nosotros proponemos que el mecanismo molecular de la biosíntesis de microfibrillas de celulosa bacteriana es más similar al que se ha propuesto para plantas, es decir, que el mecanismo de acción de la celulasa CelC consiste en la hidrólisis del polímero de nueva formación (lípido transportador-oligómero de glucosa) (Figura 107), liberando un polímero formado por tres moléculas de glucosa que pasarán a formar parte de la cadena que finalmente formará la celulosa, permitiendo que el CelA prosiga con la adición de residuos de glucosa al lípido transportador.

Este modelo explicaría por qué el mutante que no tiene operativo el gen *celC* origina la formación de unas microfibrillas muy largas que provocan que se formen agregados entre las bacterias y floculen en medio líquido, ya que en este caso, los oligómeros de glucosa sintetizados por la proteína CelA continuarían su elongación al estar inoperativo el gen *celC*. Por el contrario, el mutante superproductor, al tener un exceso de actividad correspondiente al gen *celC*, degradaría los oligómeros de glucosa sintetizados por CelA impidiendo su transporte a través de las membranas y la subsiguiente formación de microfibrillas que se extienden fuera de la célula. Además, estos oligómeros degradados sin el lípido transportador se acumulan en el interior de la célula más concretamente en las zonas de crecimiento (polos y septo).

Por otro lado, el papel de la celulosa en la **formación y maduración de biopelículas** es una característica importante que aún no ha sido ampliamente caracterizada en los rizobios. Debido a que estas cepas constituyen un modelo excelente para aclarar el papel de la síntesis de celulosa en la formación de agregados y la adhesión de *Rhizobium*, también se analizó su capacidad de producir biopelículas en raíces de plantas y diferentes superficies abióticas. Nuestros resultados muestran que la colonización de la raíz y la formación de

biofilms se redujeron significativamente tanto en los mutantes defectivos en la biosíntesis de celulosa como en los que presentaban unas microfibrillas de mayor longitud en ambos sustratos, por la sobreexpresión y delección del gen *celC*, respectivamente.

Este hecho se debe, por un lado, a la incapacidad de formar biofilms maduros por parte de la cepa ANU843C2⁺ ya que las microfibrillas de celulosa intervienen en el mantenimiento de la estructura tridimensional de estas formaciones como se ha descrito en otras β -proteobacterias (Da Re *et al.*, 2007). Y, en el caso de la cepa ANU843 Δ C2, a una mayor agregación entre las bacterias dando lugar a la formación de flóculos que entorpecen la correcta colonización de las superficies ya que son fácilmente desprendidos de éstas. Todos ellos ponen de manifiesto que los mecanismos de adhesión de las bacterias al sustrato y aquellos posteriores de colonización masiva mediante la formación de estructuras tridimensionales por agregación de nuevas bacterias sobre las ya existentes, son dos procesos independientes en los que intervienen distintas moléculas.

Cabe señalar que nuestros resultados difieren ligeramente de los publicados por Williams *et al.* (2008), quienes encontraron que una cepa mutante en el gen *celA* no productora de celulosa presentaba alteraciones en la formación de biopelículas *in planta*, pero no *in vitro*. Podría plantearse si este hecho es debido a que el mecanismo por el cual el mutante presenta una limitación en la biosíntesis de celulosa también difiere, pero dado que en ambos ensayos se han utilizado métodos distintos de determinación de biopelículas, las conclusiones inferidas podrían ser erróneas. Con respecto a este problema sería deseable que, pese a las dificultades de reproducibilidad de este tipo de ensayos *in vitro*, se llevara a cabo su estandarización para poder comparar los resultados obtenidos por distintos grupos de investigación.

Por otro lado, existe un estudio en el que se observa cómo mutantes superproductores de celulosa obtenidos por mutación de los genes reguladores *celG* y *cell* en *A. tumefaciens* forman unos agregados más voluminosos y compactos en las raíces de tomate sin lavar (Matthysse *et al.*, 2005). Así, basándose en estos ensayos realizados mediante microscopía óptica, estos autores concluyen que existe una mayor formación de biofilms, sin embargo parece que en realidad el fenotipo observado es similar al que hemos encontrado en la cepa ANU843 Δ C2 y que son estructuras que no están realmente asociadas a la raíz, tal y como demuestran los datos que ellos obtienen en el ensayo de recuento de bacterias adheridas firmemente, que arrojan la presencia de un menor número de bacterias superproductoras de la celulosa adheridas que las obtenidas en el estudio con la cepa silvestre. Quizá también en este caso convendría replantearse si la definición de biofilm como conjunto de bacterias asociadas a un sustrato es literalmente correcta ya que, por ejemplo las películas que se forman sobre superficies acuosas también se consideran biofilms y no están ancladas a un sustrato.

Este trabajo supone la primera evidencia de la participación de una celulosa bacteriana no sólo en la degradación de la pared vegetal, sino también en la autorregulación de la longitud de las microfibrillas de celulosa producidas por la propia bacteria, mostrando una interesante analogía entre el proceso de biosíntesis de celulosa en bacterias, en las que probablemente se encuentre el origen evolutivo de estos procesos, y en plantas superiores. Este papel del gen

celC en la biosíntesis de celulosa difiere claramente de la función establecida como una endoglucanasa involucrada en el proceso de infección y este hecho nos hace pensar que pueda tener también un mecanismo de regulación independiente.

Los resultados obtenidos sobre la expresión de los genes *celABC* muestran cómo se transcriben formando un único fragmento de ARN mensajero policistrónico en *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ANU843, por lo que claramente los tres genes constituyen un operón. Sin embargo, el hecho de que se haya localizado un posible promotor interno del gen *celC* que se encuentra precedido por un motivo Shine-Dalgarno, junto con los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación en los que se ha determinado por zimograma que las cepas que tienen una mutación en los genes *celA* o *celB* en *R. leguminosarum* bv. trifolii R200 (Ausmees *et al.*, 1999) mantienen su capacidad de producir la celulasa CelC2 (datos no mostrados), apoyan el hecho de que pueda existir algún tipo de mecanismo de regulación interna o postranscripcional de forma que el gen *celC* pueda tener una expresión independiente a sus predecesores.

Según los resultados obtenidos, nosotros proponemos que el papel de este enzima en la producción de celulosa puede reflejar un evento evolutivo anterior, ya que esta propiedad está codificada por un operón que es común en todos los rizobios con capacidad para nodular, incluyendo cepas de los géneros *Burkholderia* y *Cupriavidus*, incluidas dentro de los β -Proteobacteria (Moulin *et al.*, 2001), mientras que la función del gen codificado por la celulasa *celC* en la infección pudo haber sido desarrollado posteriormente. El hecho de que este gen tenga una función tanto en la colonización como en la infección, mediante su papel en la biosíntesis de la celulosa y de forma independiente como molécula que permite a la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii la penetración en los pelos radicales y la liberación en los simbiosomas, implica la posible existencia de dos conjuntos diferentes de mecanismos de control.

En este trabajo además, se ha secuenciado el gen *celC* en cepas de diferentes especies y biovariedades del género *Rhizobium* y la filogenia de este gen se ha comparado con las de otros genes cromosómicos básicos (16S, *recA* y *atpD*) y simbióticos (*nodC*) que en las especies de crecimiento rápido se encuentran localizados en plásmidos. Los resultados muestran que la **filogenia del gen *celC*** es totalmente congruente con las basadas en los genes 16S, *recA* y *atpD* y que, por tanto, no existe correlación con la filogenia basada en el gen simbiótico *nodC*.

Sin embargo, a pesar de la coincidencia en la distribución de las especies en el árbol filogenético, las distancias obtenidas para el gen *celC* fueron ligeramente superiores a las inferidas a partir del análisis del gen ribosómico 16S e incluso de los genes *recA* y *atpD*. Este hecho nos permite proponer al gen *celC* como un marcador taxonómico complementario para analizar el estatus taxonómico de algunas cepas pertenecientes al género *Rhizobium*. Por otro lado, el amplio análisis filogenético abordado en esta memoria nos permite hacer una serie de consideraciones que serán muy útiles para futuros estudios taxonómicos, especialmente las relativas a cepas cuyos genomas han sido completamente secuenciados:

- Sorprendentemente, la especie *R. indigoferae* presenta unos valores de identidad altos respecto al gen *celC* con respecto a *R. leguminosarum* (99,1%), lo cual sugiere que ambos pertenecen a la misma especie. El análisis de los genes “housekeeping” apoya esta teoría ya que las identidades fueron superiores al 99% en todos los casos. Resultados similares de identidad entre los genes 16S, *atpD* y *recA* y cerca del 95% en el *celC* se han encontrado también entre las cepas de *R. fabae* y *R. pisi*, por lo que parece que también se tratan de la misma especie. Por tanto, deberían llevarse a cabo estudios taxonómicos complementarios para llevar a cabo una correcta clasificación de *R. indigoferae* y *R. fabae*.

- Varias especies cuyos genomas han sido completamente secuenciados han sido clasificadas dentro de la especie *R. leguminosarum*, tal como *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM1325 y *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM2304. Para todas ellas, el análisis tanto de los genes “housekeeping” como del gen *celC* sugiere que no han sido correctamente clasificadas, por lo que es evidente que su estatus taxonómico debe ser revisado de acuerdo con los criterios actuales de definición de especies.

- En cuanto a la correcta nomenclatura de la cepa NGR234, no sólo debería ser reclasificada dentro del género *Sinorhizobium* (*Ensifer*) como ya se ha comentado, sino que además hay que considerar que debido al bajo porcentaje de identidad entre la secuencia de sus genes *recA* y *atpD* con respecto a las especies del género *Ensifer*, probablemente pertenezca a una nueva especie del género *Ensifer*. Sin embargo, se necesitarían más cepas de este grupo para poder definir una nueva especie según las recomendaciones del Subcomité de taxonomía de *Agrobacterium* y *Rhizobium* (Lindstrom y Young, 2009).

Por tanto, parece que varias de las cepas que han sido seleccionadas para la completa secuenciación de su genoma pertenecen a una especie diferente de la que habían sido asignadas. Este hecho representa un problema mayor que en el caso del resto de cepas, ya que, debido a las múltiples ventajas que la disponibilidad de la secuencia del genoma conlleva, estas cepas son las que actualmente se están usando como modelo de estudio en los laboratorios, y por tanto, las características y conclusiones obtenidas tras su análisis estarán asignadas de forma errónea a otras especies. En la actualidad disponemos de las herramientas necesarias para llevar a cabo una clasificación correcta de las especies, especialmente de aquellas cuyos genomas completos están disponibles, hace que el nombramiento correcto de estas especies sea inexcusable.

Los datos presentados en este trabajo abren **perspectivas** prometedoras para la investigación de la implicación de los enzimas hidrolíticos de la pared celular vegetal producidos por *Rhizobium* en el establecimiento de la simbiosis con leguminosas. En este sentido, consideramos que para ampliar el conocimiento acerca de las funciones simbióticas del gen *celC* sería igualmente de interés conocer si su expresión favorece la colonización endofítica de plantas leguminosas y no leguminosas. Por otro lado, actualmente se conoce el efecto que la expresión de esta endoglucanasa tiene sobre la bacteria, sin embargo, para conocer qué efectos podría tener sobre el fondo genético de la planta sería necesario llevar a cabo la transformación de la planta con este gen y elaborar ensayos de infección y nodulación.

El gen *celC* presenta una expresión constitutiva, probablemente relacionada con su implicación en la biosíntesis de celulosa. Sin embargo, para ampliar el conocimiento acerca de la regulación de este gen y del operón sería de interés la construcción en el futuro de fusiones transcripcionales que faciliten el estudio de su patrón de expresión *in vivo* e *in planta* determinando además el grado de implicación de la leguminosa hospedadora en el proceso. Estos estudios, junto con la introducción de los genes responsables de la producción de celulasas en otras cepas de microorganismos endosimbióticos, permitirán obtener la medida real de la magnitud de este determinante de la infectividad y evaluar las posibilidades de su utilidad agronómica.

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes y los resultados de esta investigación, también será preciso completar en el futuro las experiencias aquí realizadas con estudios del papel de los genes homólogos al gen *celC* en diferentes especies de rizobios con el objetivo final de abordar su especificidad en la simbiosis y la posible ampliación del rango de hospedador, facilitando la penetración de las bacterias en las células radicales por una degradación previa de la pared celular de éstas con enzimas hidrolíticos. Esta posibilidad propiciaría el desarrollo de una agricultura más respetuosa con el medio ambiente al favorecer la utilización de *Rhizobium* como fertilizante biológico con la consiguiente reducción en la utilización de fertilizantes químicos.

CONCLUSIONES

1. La producción de enzimas celulolíticos es una capacidad que comparten los microorganismos que nodulan leguminosas. En general, la actividad celulolítica detectada en los rizobios es relativamente baja en comparación con la producida por bacterias fitopatógenas y las cepas que presentaron una mayor actividad fueron las representantes de los géneros *Rhizobium*, *Phyllobacterium* y *Azorhizobium*.
2. La producción de la celulasa CelC2 por parte de la cepa ANU843 de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii está determinada por el gen *celC*, que presenta una sola copia en su fondo genético y se encuentra ampliamente distribuido y conservado en los genomas de las especies del género *Rhizobium*. El análisis de su secuencia aminoacídica muestra que esta proteína pertenece a la familia 8 de las glicosil hidrolasas y predice que es excretada al espacio periplásmico de la bacteria donde permanece adherida a la membrana externa.
3. La filogenia del gen *celC* está correlacionada con la obtenida sobre la base de genes cromosómicos conservados que codifican para proteínas esenciales, pero no con la de genes accesorios localizados en el plásmido simbiótico y relacionados con la especificidad de hospedador. La secuencia del gen *celC* incluso resulta más resolutive que los genes *recA* y *atpD* para la diferenciación entre especies taxonómicamente muy próximas entre sí, por lo que podría ser útil como marcador taxonómico del género *Rhizobium*.
4. La celulasa CelC2 cumple un papel esencial en los procesos de infección primaria y secundaria necesarios para el desarrollo de la simbiosis fijadora de nitrógeno canónica entre *R. leguminosarum* bv. trifolii y trébol blanco. Esta enzima degrada específicamente la celulosa no cristalina de la pared celular, cuya localización en las plantas de trébol se restringe al extremo de los pelos radicales y canales de infección en crecimiento, por tanto es la responsable de crear la vía de entrada del microsimbionte en la raíz de la planta facilitando a la bacteria su liberación en las células del nódulo que se encuentran en desarrollo. Sin embargo, la celulasa CelC2 no es indispensable para la invasión a través de espacios intercelulares o grietas de la planta.

5. La sobreexpresión de la celulasa CelC2 en *R. leguminosarum* bv. trifolii incrementa la competitividad de la cepa ANU843 y la transferencia del gen *celC* a otro microorganismo que no la posee en su fondo genético, como *Sinorhizobium meliloti* 1021, posibilita la invasión bacteriana a través de los pelos radicales en trébol, aunque no se forman canales de infección.
6. La consecución de una infección canónica compatible y efectiva en la fijación de nitrógeno, requiere que la producción de gen CelC2 esté estrechamente regulada por parte de la bacteria, tal y como demuestran los ensayos relacionados con la transducción de señales mediada por los factores de nodulación en las primeras etapas de la simbiosis, los signos de respuesta defensiva por parte de la planta, la organogénesis de los nódulos y el desarrollo de los simbiosomas.
7. La biosíntesis de celulosa es una capacidad conservada entre las distintas cepas de microorganismos que nodulan leguminosas. En general, los microorganismos que presentaron una mayor producción de celulosa pertenecen a los géneros *Rhizobium* y *Mesorhizobium*, mientras que los representantes de los géneros *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium* mostraron una menor afinidad por el Rojo Congo.
8. El operón *celABC*, involucrado en la biosíntesis de celulosa, se transcribe como un único fragmento de ARNm policistrónico la cepa ANU843 de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. La presencia de genes que codifican glicosiltransferasas homólogos al gen *celA* aguas arriba de genes ortólogos al *celC* formando un operón posiblemente también implicado en este proceso, es un hecho frecuente entre las especies de la familia *Rhizobiaceae*.
9. El gen *celC*, además, juega un papel importante en la biosíntesis de celulosa ya que interviene en la modulación de la longitud de las microfibrillas de celulosa sintetizadas por la bacteria que, a su vez, intervienen en la adhesión y formación de biofilms por parte de las bacterias tanto en la raíz de la planta como en superficies abióticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, O. M., Riva, O. y Peltzer, E. (2004).** Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13548-13553.
- Álvarez-Martínez, E. R., Valverde, A., Ramírez-Bahena, M. H., García-Fraile, P., Tejedor, C., Mateos, P. F., Santillana, N., Zuniga, D., Peix, A. y Velázquez, E. (2009).** The analysis of core and symbiotic genes of rhizobia nodulating *Vicia* from different continents reveals their common phylogenetic origin and suggests the distribution of *Rhizobium leguminosarum* strains together with *Vicia* seeds. *Arch Microbiol* **191**, 659-668.
- Alzari, P. M., Souchon, H. y Domínguez, R. (1996).** The crystal structure of endoglucanase CelA, a family 8 glycosyl hydrolase from *Clostridium thermocellum*. *Structure* **4**, 265-275.
- Allen, O. N. y Allen, E. K. (1981).** *The Leguminosae, a source book of characteristics, uses, and nodulation*. Madison, Wisc.: University of Wisconsin Press.
- Amarger, N., Macheret, V. y Laguerre, G. (1997).** *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 996-1006.
- An, J. M., Lim, W. J., Hong, S. Y., Shin, E. C., Kim, E. J., Kim, Y. K., Park, S. R. y Yun, H. D. (2004).** Cloning and characterization of ce/8A gene from *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii 1536. *Lett Appl Microbiol* **38**, 296-300.
- Angle, J.-S. (1986).** Pectic and proteolytic enzymes produced by fast- and slow-growing soybean rhizobia. *Soil Biol Biochem* **18**, 115-116.
- Ardourel, M., Demont, N., Debelle, F., Maillet, F., de Billy, F., Prome, J. C., Denarie, J. y Truchet, G. (1994).** *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell* **6**, 1357-1374.
- Ausmees, N., Jonsson, H., Hoglund, S., Ljunggren, H. y Lindberg, M. (1999).** Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *Microbiology* **145** (Pt 5), 1253-1262.
- Ausmees, N., Jacobsson, K. y Lindberg, M. (2001).** A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin, RapA, belongs to a family of *Rhizobium*-adhering proteins (Rap) in *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *Microbiology* **147**, 549-559.
- Bashan, Y., Holguin, G. y de-Bashan, L. E. (2004).** *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can J Microbiol* **50**, 521-577.
- Benson, D. y Silvester, W. (1993).** Biology of *Frankia* Strains; Actinomycete Symbionts of Actinorhizal Plants. *Microbiol Reviews* **57**, 293-319.
- Biederbeck, V. O., Bouman, O. T., Campbell, C. A., Bailey, L. D. y Winklema, G. E. (1991).** Nitrogen benefits from four green-manure legumes in dryland cropping systems. *Can J Plant Sci* **76**, 307-315.
- Biely, P., Markovic, O. y Mislovicova, D. (1985).** Sensitive detection of endo-1,4-beta-glucanases and endo-1,4-beta-xylanases in gels. *Anal Biochem* **144**, 147-151.
- Birney, E., Stamatoyannopoulos, J. A., Dutta, A., Guigo, R., Gingeras, T. R., et al. (2007).** Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* **447**, 799-816.
- Bohlool, B. B., KLadha, J., Garrity, D. P. y George, T. (1992).** Biological nitrogen fixation for suitable agriculture: A perspective. *Plant and Soil* **141**, 1-11.
- Bowling, S. A., Guo, A., Cao, H., Gordon, A. S., Klessig, D. F. y Dong, X. (1994).** A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**, 1845-1857.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brenner, S. E. (1995).** BLAST, Blitz, BLOCKS and BEAUTY: sequence comparison on the net. *Trends Genet* **11**, 330-331.
- Brewin, N. (1991).** Development of the legume root nodule. *Annu Rev Cell Biol* **7**, 191-226.

- Brewin, N. J., Rae, A. L., Perotto, S., Kannenberg, E. L., Rathbun, E. A., Lucas, M. M., Gunder, A., Bolanos, L., Kardailsky, I. V. y Wilson, K. E. (1994). Bacterial and plant glycoconjugates at the *Rhizobium*-legume interface. *Biochem Soc Symp* **60**, 61-73.
- Brewin, N. J. (2004). Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*-Legume symbiosis. . *Critical Reviews in Plant Sciences* **23**, 293-316.
- Broughton, W. J. y Perret, X. (1999). Genealogy of legume-*Rhizobium* symbioses. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 305-311.
- Bueno, P., Soto, M. J., Rodríguez-Rosales, M. P., Sanjuan, J., Olivares, J. y Donaire, J. (2001). Time course of lipoxygenase, antioxidant enzyme activities and H₂O₂ accumulation during the early stages of *Rhizobium*-legume symbiosis. *New Phytol* **152**, 91-96.
- Cabanes, D., Boistard, P. y Batut, J. (2000). Identification of *Sinorhizobium meliloti* genes regulated during symbiosis. *J Bacteriol* **182**, 3632-3637.
- Callaham, D. A. y Torrey, J. G. (1981). The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can J Bot* **59**, 1647-1664.
- Capoen, W., Oldroyd, G., Goormachtig, S. y Holsters, M. (2010). *Sesbania rostrata*: a case study of natural variation in legume nodulation. *New Phytol* **186**, 340-345.
- Carden, D. E. y Felle, H. H. (2003). The mode of action of cell wall-degrading enzymes and their interference with Nod factor signalling in *Medicago sativa* root hairs. *Planta* **216**, 993-1002.
- Cárdenas, L., Martínez, A., Sánchez, F. y Quinto, C. (2008). Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). *Plant J* **56**, 802-813.
- Casida, L. E. (1982). *Ensifer adherens* gen nov. sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. *Int J Syst Bacteriol* **32**, 339-345.
- Ceballos, R., Brevis, H., Ortega, F. y Quiroz, A. (1980). Effect of five postemergence herbicides on red clover shoot and root growth in greenhouse studies. *Phytoprotection* **85**, 153-160.
- Costechareyre, D., Rhouma, A., Lavire, C., Portier, P., Chapulliot, D., Bertolla, F., Boubaker, A., Dessaux, Y. y Nesme, X. (2010). Rapid and Efficient Identification of *Agrobacterium* Species by *recA* Allele Analysis : *Agrobacterium recA* Diversity. *Microb Ecol*.
- Coutinho, P. M. y Henrissat, B. (1999). The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. En *Genetics, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation*, pp. 15-23. Editado por K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karitay T. Kimura. Tokyo: Uni Publishers Co.
- Cowling, E., Galloway, J., Furiness, C., Barber, M., Bresser, T., Cassman, K., Erisman, J. W., Haeuber, R., Howarth, R., Melillo, J., Moomaw, W., Mosier, A., Sanders, K., Seitzinger, S., Smeulders, S., Socolow, R., Walters, D., West, F. y Zhu, Z. (2001). Optimizing nitrogen management in food and energy production and environmental protection: summary statement from the *Second International Nitrogen Conference*. *Scientific World Journal* **1**, 1-9.
- Crews, T. E. (1999). The presence of nitrogen fixing legumes in terrestrial communities: Evolutionary vs ecological considerations. *Biogeochemistry* **46**, 233-246.
- Chalifour, F. P. y Benhamou, N. (1989). Indirect evidence for cellulase production by *Rhizobium* in pea root nodules during bacteroid differentiation: cytochemical aspects of cellulose breakdown in rhizobial droplets. *Can J Microbiol* **35**, 821-829.
- Chang, C., Damiani, I., Puppo, A. y Frendo, P. (2009). Redox changes during the legume-*rhizobium* symbiosis. *Mol Plant* **2**, 370-377.
- Charron, D., Pingret, J. L., Chabaud, M., Journet, E. P. y Barker, D. G. (2004). Pharmacological evidence that multiple phospholipid signaling pathways link *Rhizobium* nodulation factor perception in *Medicago truncatula* root hairs to intracellular responses, including Ca²⁺ spiking and specific *ENOD* gene expression. *Plant Physiol* **136**, 3582-3593.
- Cheng, H. P. y Walker, G. C. (1998). Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **180**, 5183-5191.
- Christensen, H. y Olsen, J. E. (1998). Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on DNA sequence comparison of *atpD* encoding the beta subunit of ATP synthase. *FEMS Microbiol Lett* **161**, 89-96.
- Christensen, H., Kuhnert, P., Olsen, J. E. y Bisgaard, M. (2004). Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1601-1609.

- Da Re, S., Le Quere, B., Ghigo, J. M. y Beloin, C. (2007).** Tight modulation of *Escherichia coli* bacterial biofilm formation through controlled expression of adhesion factors. *Appl Environ Microbiol* **73**, 3391-3403.
- Davey, M. E. y O'Toole, G. A. (2000).** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 847-867.
- Dazzo, F. B. y Hrabak, E. M. (1981).** Presence of trifoliin A, a *Rhizobium*-binding lectin, in clover root exudate. *J Supramol Struct Cell Biochem* **16**, 133-138.
- Dazzo, F. B., Truchet, G. L., Sherwood, J. E., Hrabak, E. M., Abe, M. y Pankratz, S. H. (1984).** Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis. *Appl Environ Microbiol* **48**, 1140-1150.
- Dazzo, F. B., Truchet, G. L., Hollingsworth, R. I., Hrabak, E. M., Pankratz, H. S., Philip-Hollingsworth, S., Salzwedel, J. L., Chapman, K., Appenzeller, L. y Squartini, A. (1991).** *Rhizobium* lipopolysaccharide modulates infection thread development in white clover root hairs. *J Bacteriol* **173**, 5371-5384.
- Dazzo, F. B., Orgambide, G. G., Philip-Hollingsworth, S., Hollingsworth, R. I., Ninke, K. O. y Salzwedel, J. L. (1996).** Modulation of development, growth dynamics, wall crystallinity, and infection sites in white clover root hairs by membrane chitolipooligosaccharides from *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *J Bacteriol* **178**, 3621-3627.
- De Hoff, P. L., Brill, L. M. y Hirsch, A. M. (2009).** Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Mol Genet Genomics* **282**, 1-15.
- Deinema, M. H. y Zevenhuizen, L. P. (1971).** Formation of cellulose fibrils by gram-negative bacteria and their role in bacterial flocculation. *Arch Mikrobiol* **78**, 42-51.
- Den Herder, G. y Parniske, M. (2009).** The unbearable naivety of legumes in symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 491-499.
- Ding, Y., Kalo, P., Yendrek, C., Sun, J., Liang, Y., Marsh, J. F., Harris, J. M. y Oldroyd, G. E. (2008).** Abscisic acid coordinates nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **20**, 2681-2695.
- Dobert, R. C., Breil, B. T. y Triplett, E. W. (1994).** DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationship to those of other nodulating bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **7**, 564-572.
- Dong, X. (1998).** SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr Opin Plant Biol* **1**, 316-323.
- Downie, J. A. (2010).** The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 150-170.
- Doyle, J. J. y Luckow, M. A. (2003).** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* **131**, 900-910.
- Ehrhardt, D. W., Wais, R. y Long, S. R. (1996).** Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* **85**, 673-681.
- Eisen, J. A. (1995).** The *RecA* protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: comparison of trees of *RecAs* and 16S rRNAs from the same species. *J Mol Evol* **41**, 1105-1123.
- Endelin, C. y Meeks, J. (1983).** Pure culture and reconstitution of the *Anthocereos-Nostoc* symbiotic association. *Planta* **158**, 157-165.
- Enyedi, A. J., Yalpani, N., Silverman, P. y Raskin, I. (1992).** Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2480-2484.
- Erismann, J. W. (2004).** The Nanjing Declaration on Management of Reactive Nitrogen. *BioScience* **54**, 286-287.
- Esseling, J. J., Lhuissier, F. G. y Emons, A. M. (2003).** Nod factor-induced root hair curling: continuous polar growth towards the point of nod factor application. *Plant Physiol* **132**, 1982-1988.
- Fähraeus, G. (1957).** The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J Gen Microbiol* **16**, 374-381.
- Farrand, S. K., Van Berkum, P. B. y Oger, P. (2003).** *Agrobacterium* is a definable genus of the family *Rhizobiaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1681-1687.
- 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 U S A* **76**, 1648-1652.

- Finnie, C., Zorreguieta, A., Hartley, N. M. y Downie, J. A. (1998). Characterization of *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide glycanases that are secreted via a type I exporter and have a novel heptapeptide repeat motif. *J Bacteriol* **180**, 1691-1699.
- Fischer, H. M. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev* **58**, 352-386.
- Foucher, F. y Kondorosi, E. (2000). Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Mol Biol* **43**, 773-786.
- Fred, E. B., Baldwin, I. L. y McCoy, E. (1932). *Root nodule bacteria and leguminous plants*. Madison, WI USA: Univ of Wisconsin Press.
- Fujishige, N. A., Kapadia, N. N., De Hoff, P. L. y Hirsch, A. M. (2006a). Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS Microbiol Ecol* **56**, 195-206.
- Fujishige, N. A., Kapadia, N. N. y Hirsch, A. M. (2006b). A feeling for the micro-organism: structure on a small scale. Biofilms on plant roots. *Botanical Journal of the Linnean Society* **150**, 79-88.
- Fujishige, N. A., Lum, M. R., De Hoff, P. L., Whitelegge, J. P., Faull, K. F. y Hirsch, A. M. (2008). *Rhizobium* common nod genes are required for biofilm formation. *Mol Microbiol* **67**, 504-515.
- Gage, D. J. y Margolin, W. (2000). Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Curr Opin Microbiol* **3**, 613-617.
- Gage, D. J. (2002). Analysis of infection thread development using Gfp- and DsRed-expressing *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **184**, 7042-7046.
- 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., Puhler, A., Abola, P., *et al.* (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**, 668-672.
- Galloway, J. N. (2005). The global nitrogen cycle: past, present and future. *Sci China C Life Sci* **48 Spec No**, 669-677.
- Galloway, J. N., Townsend, A. R., Erisman, J. W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J. R., Martinelli, L. A., Seitzinger, S. P. y Sutton, M. A. (2008). Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science* **320**, 889-892.
- García-Fraile, P., Mulas-García, D., Peix, A., Rivas, R., González-Andrés, F. y Velázquez, E. (2010). *Phaseolus vulgaris* is nodulated in northern Spain by *Rhizobium leguminosarum* strains harboring two *nodC* alleles present in American *Rhizobium etli* strains: biogeographical and evolutionary implications. *Can J Microbiol* **56**, 657-666.
- García-Rodríguez, F. M. y Toro, N. (2000). *Sinorhizobium meliloti nfe* (nodulation formation efficiency) genes exhibit temporal and spatial expression patterns similar to those of genes involved in symbiotic nitrogen fixation. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 583-591.
- Gaunt, M. W., Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S. A. y Young, J. P. (2001). Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 2037-2048.
- Geelen, D., van Montagu, M. y Holsters, M. (1995). Cloning of an *Azorhizobium caulinodans* endoglucanase gene and analysis of its role in symbiosis. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3304-3310.
- Geremia, R. A., Cavaignac, S., Zorreguieta, A., Toro, N., Olivares, J. y Ugalde, R. A. (1987). A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharide but fails to form beta-(1-2) glucan. *J Bacteriol* **169**, 880-884.
- Geurts, R. y Bisseling, T. (2002). *Rhizobium* nod factor perception and signalling. *Plant Cell* **14 Suppl**, S239-249.
- Gibson, K. E., Kobayashi, H. y Walker, G. C. (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu Rev Genet* **42**, 413-441.
- Gilles-González, M. A., Ditta, G. S. y Helinski, D. R. (1991). A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Nature* **350**, 170-172.
- Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., *et al.* (2007). Legumes symbioses: absence of *Nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science* **316**, 1307-1312.
- Gleason, C., Chaudhuri, S., Yang, T., Munoz, A., Poovaiah, B. W. y Oldroyd, G. E. (2006). Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* **441**, 1149-1152.

- González, V., Santamaria, 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.
- Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., *et al.* (2001). Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**, 2323-2328.
- Goormachtig, S., Capoen, W., James, E. K. y Holsters, M. (2004). Switch from intracellular to intercellular invasion during water stress-tolerant legume nodulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6303-6308.
- Gray, J. X. y Rolfe, B. G. (1990). Exopolysaccharide production in *Rhizobium* and its role in invasion. *Mol Microbiol* **4**, 1425-1431.
- Green, F., 3rd, Clausen, C. A. y Highley, T. L. (1989). Adaptation of the Nelson-Somogyi reducing-sugar assay to a microassay using microtiter plates. *Anal Biochem* **182**, 197-199.
- Guisseppi, A., Aymeric, J. L., Cami, B., Barras, F. y Creuzet, N. (1991). Sequence analysis of the cellulase-encoding *celY* gene of *Erwinia chrysanthemi*: a possible case of interspecies gene transfer. *Gene* **106**, 109-114.
- Gulash, M., Ames, P., Larosiliere, R. C. y Bergman, K. (1984). Rhizobia are attracted to localized sites on legume roots. *Appl Environ Microbiol* **48**, 149-152.
- Hanahan, D., Jessee, J. y Bloom, F. R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* **204**, 63-113.
- Hematy, K., Cherk, C. y Somerville, S. (2009). Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 406-413.
- Herridge, D. F., Peoples, M. B. y Boddey, R. M. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems *Plant and Soil* **311**, 1-18.
- Higashi, S. y Abe, M. (1980). Scanning Electron Microscopy of *Rhizobium trifolii* Infection Sites on Root Hairs of White Clover. *Appl Environ Microbiol* **40**, 1094-1099.
- Hirsch, A. M. (1999). Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 320-326.
- Hirsch, S., Kim, J., Muñoz, A., Heckmann, A. B., Downie, J. A. y Oldroyd, G. E. (2009). GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **21**, 545-557.
- Honegger, R. (1991). Functional aspects of the lichen symbiosis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 553-578.
- Hu, C. Y., Tseng W.S., Hsieh S.L., Chen Y.C., Cheng H.L. y Yang, S. S. (2009). Electron microscopy analysis of carboxymethylcellulase in rhizobia. *Soil Biology & Biochemistry* **41**, 431-434.
- Hubbell, D. H., Morales, V. M. y Umali-Garcia, M. (1978). Pectolytic enzymes in *Rhizobium*. *Appl Environ Microbiol* **35**, 210-213.
- Hurek, T., Handley, L. L., Reinhold-Hurek, B. y Piche, Y. (2002). *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 233-242.
- Iannetta, P., McMillan, G. y Sprent, J. I. (1997). Plant cell wall-degrading enzymes of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae: their role in avoiding the host-plant defense response. *Soil Biol Biochem* **29**, 1019-1021.
- Iglesias, O., Rivas, R., García-Fraile, P., Abril, A., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. y Velázquez, E. (2007). Genetic characterization of fast-growing rhizobia able to nodulate *Prosopis alba* in North Spain. *FEMS Microbiol Lett* **277**, 210-216.
- Igual, J. M., Velázquez, E., Mateos, P. F., Rodríguez-Barrueco, C., Cervantes, E. y Martínez-Molina, E. (2001). Cellulase isoenzyme profiles in *Frankia* strains belonging to different cross-inoculation groups *Plant and Soil* **229**, 35-39.
- Imperial, J., Hoover, T. R., Madden, M. S., Ludden, P. W. y Shah, V. K. (1989). Substrate reduction properties of dinitrogenase activated in vitro are dependent upon the presence of homocitrate or its analogues during iron-molybdenum cofactor synthesis. *Biochemistry* **28**, 7796-7799.
- Iñiguez, A. L., Dong, Y. y Triplett, E. W. (2004). Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 1078-1085.

- Jamet, A., Mandon, K., Puppo, A. y Herouart, D. (2007).** H₂O₂ is required for optimal establishment of the *Medicago sativa*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *J Bacteriol* **189**, 8741-8745.
- Jarvis, B. D., Downer, H. L. y Young, J. P. (1992).** Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia support synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 93-96.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. y Bevan, M. W. (1987).** GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo J* **6**, 3901-3907.
- Jiménez-Zurdo, J. I. (1993).** Estudio de la producción de enzimas celulolíticos y pectinolíticos por las bacterias del género *Rhizobium*: Universidad de Salamanca.
- Jiménez-Zurdo, J. I., Mateos, P. F., Dazzo, F. B. y Martínez-Molina, E. (1996a).** Cell-bound cellulase and polygalacturonase production by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. *Soil Biol Biochem* **28**, 917-921.
- Jiménez-Zurdo, J. I., Mateos, P. F., Dazzo, F. B. y Martínez-Molina, E. (1996b).** Influence of the symbiotic plasmid (pSym) on cellulase production by *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ANU843. *Soil Biol Biochem* **28**, 131-133.
- 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.
- Jonhson, F. (1990).** Detection method of nitrogen (total) in fertilizers. En *Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, pp. 17-19. Editado por K. Elrich: Association of Official Analytical Chemists, USA.
- Jordan, D. C. (1984).** *Family III. Rhizobiaceae*. Baltimore: Willians and Wilkins.
- Journet, E. P., El-Gachtouli, N., Vernoud, V., de Billy, F., Pichon, M., Dedieu, A., Arnould, C., Morandi, D., Barker, D. G. y Gianinazzi-Pearson, V. (2001).** *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 737-748.
- Kalo, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R. M., Hirsch, S., Jakab, J., Sims, S., Long, S. R., Rogers, J., Kiss, G. B., Downie, J. A. y Oldroyd, G. E. (2005).** Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* **308**, 1786-1789.
- 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., Shimpō, 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., Shimpō, 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.
- Kereszt, A., Slaska-Kiss, K., Putnoky, P., Banfalvi, Z. y Kondorosi, A. (1995).** The cycHJKL genes of *Rhizobium meliloti* involved in cytochrome c biogenesis are required for "respiratory" nitrate reduction ex planta and for nitrogen fixation during symbiosis. *Mol Gen Genet* **247**, 39-47.
- Kimura, M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111-120.
- Kneen, B. E. y Larue, T. A. (1983).** Congo Red Absorption by *Rhizobium leguminosarum*. *Appl Environ Microbiol* **45**, 340-342.
- Kneip, C., Lockhart, P., Voss, C. y Maier, U. G. (2007).** Nitrogen fixation in eukaryotes--new models for symbiosis. *BMC Evol Biol* **7**, 55.
- Knight, M. R. (2007).** New ideas on root hair growth appear from the flanks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20649-20650.
- Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop, R. M., 2nd y Peterson, K. M. (1994).** pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**, 800-802.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., 2nd y Peterson, K. M. (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175-176.
- Krishnan, H. B. y Pueppkea, S. G. (1994).** A cloned cellulase gene from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* is expressed in *Rhizobium fredii* but does not influence nodulation of cowpea. *FEMS Microbiology Letters*. **119**, 289-294.

- Kuykendall, L. D. (2005).** Family I. Rhizobiaceae. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 324-361. Editado por Springer. New York: D. J. Brenner
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laguerre, G., Nour, S. M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P. y Amarger, N. (2001).** Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* **147**, 981-993.
- Lasa, I. (2006).** Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *Int Microbiol* **9**, 21-28.
- Lasa, I. y Penades, J. R. (2006).** Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol* **157**, 99-107.
- Laus, M. C., van Brussel, A. A. y Kijne, J. W. (2005a).** Exopolysaccharide structure is not a determinant of host-plant specificity in nodulation of *Vicia sativa* roots. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 1123-1129.
- Laus, M. C., van Brussel, A. A. y Kijne, J. W. (2005b).** Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia sativa* root hairs. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 533-538.
- Laus, M. C., Logman, T. J., Lamers, G. E., Van Brussel, A. A., Carlson, R. W. y Kijne, J. W. (2006).** A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Mol Microbiol* **59**, 1704-1713.
- Lee, K. B., De Backer, P., Aono, T., Liu, C. T., Suzuki, S., Suzuki, T., Kaneko, T., Yamada, M., Tabata, S., Kupfer, D. M., Najar, F. Z., Wiley, G. B., Roe, B., Binnewies, T. T., Ussery, D. W., D'Haese, W., Herder, J. D., Gevers, D., Vereecke, D., Holsters, M. y Oyaizu, H. (2008).** The genome of the versatile nitrogen fixer *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *BMC Genomics* **9**, 271.
- Leigh, J. A., Signer, E. R. y Walker, G. C. (1985).** Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 6231-6235.
- Leigh, J. A. y Lee, C. C. (1988).** Characterization of polysaccharides of *Rhizobium meliloti* exo mutants that form ineffective nodules. *J Bacteriol* **170**, 3327-3332.
- Leigh, J. A. y Coplin, D. L. (1992).** Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annu Rev Microbiol* **46**, 307-346.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Prome, J. C. y Denarie, J. (1990).** Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**, 781-784.
- Leshem, Y., Seri, L. y Levine, A. (2007).** Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *Plant J* **51**, 185-197.
- Levy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhoub, B., Kulikova, O., Duc, G., Journet, E. P., Ane, J. M., Lauber, E., Bisseling, T., Denarie, J., Rosenberg, C. y Debelle, F. (2004).** A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* **303**, 1361-1364.
- Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B. y Lock, M. (2005).** *Legumes of the World*. Kew.
- Lillich, T. T. y Elkan, G. H. (1968).** Evidence countering the role of polygalacturonase in invasion of root hairs of leguminous plants by *Rhizobium* spp. *Can J Microbiol* **14**, 617-625.
- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemse, J., Bisseling, T. y Geurts, R. (2003).** LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* **302**, 630-633.
- Lin, F. C., Brown, R. M., Jr., Drake, R. R., Jr. y Haley, B. E. (1990).** Identification of the uridine 5'-diphosphoglucose (UDP-Glc) binding subunit of cellulose synthase in *Acetobacter xylinum* using the photoaffinity probe 5-azido-UDP-Glc. *J Biol Chem* **265**, 4782-4784.
- Lindstrom, K. y Young, J. P. (2009).** International committee on systematics of prokaryotes; subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*: minutes of the meetings, 31 August 2008, Gent, Belgium. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 921-922.
- Lindstrom, K., Murwira, M., Willems, A. y Altier, N. (2010).** The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Res Microbiol* **161**, 453-463.
- Ljunggren, H. y Fähræus, G. (1961).** The role of polygalacturonase in root-hair invasion by nodule bacteria. *J Gen Microbiol* **26**, 521-528.

- Ludwig, W. y Schleifer, K. H. (1994). Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Rev* **15**, 155-173.
- Lloyd, A. T. y Sharp, P. M. (1993). Evolution of the *recA* gene and the molecular phylogeny of bacteria. *J Mol Evol* **37**, 399-407.
- Macmillan, J. D. y Cooke, R. C. (1969). Evidence against involvement of pectic enzymes in the invasion of root hairs by *Rhizobium trifolii*. *Can J Microbiol* **15**, 643-645.
- Madsen, L., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J., Heckmann, A., Bek, A., Ronson, C., James, E. y Stougaard, J. (2010). The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nature Communications* **1**, Article number: 10.
- Marchetti, M., Capela, D., Glew, M., Cruveiller, S., Chane-Woon-Ming, B., Gris, C., Timmers, T., Poinso, V., Gilbert, L. B., Heeb, P., Medigue, C., Batut, J. y Masson-Boivin, C. (2010). Experimental evolution of a plant pathogen into a legume symbiont. *PLoS Biol* **8**, e1000280.
- Marechal, J., Clement, B., Nalin, R., Gandon, C., Orso, S., Cvejic, J. H., Bruneteau, M., Berry, A. y Normand, P. (2000). A *recA* gene phylogenetic analysis confirms the close proximity of *Frankia* to *Acidothermus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 2**, 781-785.
- Martínez-Abarca, F., Herrera-Cervera, J. A., Bueno, P., Sanjuan, J., Bisseling, T. y Olivares, J. (1998). Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**, 153-155.
- Martínez-Molina, E., Morales, V. M. y Hubbell, D. H. (1979). Hydrolytic Enzyme Production by *Rhizobium*. *Appl Environ Microbiol* **38**, 1186-1188.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X. y Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol* **17**, 458-466.
- Mateos, P. F., Jiménez-Zurdo, J. I., Chen, J., Squartini, A. S., Haack, S. K., Martínez-Molina, E., Hubbell, D. H. y Dazzo, F. B. (1992). Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Appl Environ Microbiol* **58**, 1816-1822.
- Mateos, P. F., Baker, B., Philip-Hollingsworth, S., Squartini, A., Peruffo, A., Nuti, M. y Dazzo, F. (1995). Direct *in situ* identification of cellulose microfibrils associated with *Rhizobium leguminosarum* biovar. trifolii attached to the root epidermis of *White clover*. *Can J Microbiol* **41**, 202-207.
- Mateos, P. F., Baker, D., Petersen, M., Velázquez, E., Jiménez-Zurdo, J. I., Martínez-Molina, E., Squartini, A., Orgambide, G., Hubbell, D. y Dazzo, F. B. (2001). Erosion of root epidermal cell walls by *Rhizobium* polysaccharide-degrading enzymes as related to primary host infection in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Can J Microbiol* **47**, 475-487.
- Mathesius, U., Journet, E. P. y Sumner, L. W. (2009). *The Medicago truncatula* handbook. : The Samuel Roberts Noble Foundation.
- Matthysse, A. G., White, S. y Lightfoot, R. (1995). Genes required for cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **177**, 1069-1075.
- Matthysse, A. G., Deschet, K., Williams, M., Marry, M., White, A. R. y Smith, W. C. (2004). A functional cellulose synthase from ascidian epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 986-991.
- Matthysse, A. G., Marry, M., Krall, L., Kaye, M., Ramey, B. E., Fuqua, C. y White, A. R. (2005). The effect of cellulose overproduction on binding and biofilm formation on roots by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 1002-1010.
- Mazel, A., Leshem, Y., Tiwari, B. S. y Levine, A. (2004). Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (AtRabG3e). *Plant Physiol* **134**, 118-128.
- Meade, H. M., Long, S. R., Ruvkun, G. B., Brown, S. E. y Ausubel, 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.
- Menna, P., Barcellos, F. G. y Hungria, M. (2009). Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 2934-2950.
- Mesa, S., Hauser, F., Friberg, M., Malaguti, E., Fischer, H. M. y Hennecke, H. (2008). Comprehensive assessment of the regulons controlled by the FixLJ-FixK2-FixK1 cascade in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* **190**, 6568-6579.
- Michaud, P., Belaich, A., Courtois, B. y Courtois, J. (2002). Cloning, sequencing and overexpression of a *Sinorhizobium meliloti* M5N1CS carboxymethyl-cellulase gene. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 767-771.

- Miller, L. D., Yost, C. K., Hynes, M. F. y Alexandre, G. (2007). The major chemotaxis gene cluster of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae is essential for competitive nodulation. *Mol Microbiol* **63**, 348-362.
- Mitra, R. M., Gleason, C. A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J. A., Oldroyd, G. E. y Long, S. R. (2004a). A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4701-4705.
- Mitra, R. M., Gleason, C. A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J. A., Oldroyd, G. E. y Long, S. R. (2004b). A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 4701-4705.
- Miwa, H., Sun, J., Oldroyd, G. E. y Downie, J. A. (2006a). Analysis of Nod-factor-induced calcium signaling in root hairs of symbiotically defective mutants of *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 914-923.
- Miwa, H., Sun, J., Oldroyd, G. E. y Downie, J. A. (2006b). Analysis of calcium spiking using a cameleon calcium sensor reveals that nodulation gene expression is regulated by calcium spike number and the developmental status of the cell. *Plant J* **48**, 883-894.
- Morales, V., Martinez-Molina, E. y Hubbell, D. (1984). Cellulase production by *Rhizobium*. *Plant Soil* **80**, 407-415.
- Morrissey, J. H. (1981). Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem* **117**, 307-310.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B. y Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* **411**, 948-950.
- Muller, M. H., Prosperi, J. M., Santoni, S. y Ronfort, J. (2003). Inferences from mitochondrial DNA patterns on the domestication history of alfalfa (*Medicago sativa*). *Mol Ecol* **12**, 2187-2199.
- Nakamura, K., Misawa, N. y Kitamura, K. (1986). Sequence of a cellulase gene of *Cellulomonas uda* CB4. *J Biotechnol* **4**, 247-254.
- Napoli, C., Dazzo, F. y Hubbell, D. (1975). Production of cellulose microfibrils by *Rhizobium*. *Appl Microbiol* **30**, 123-131.
- Nicol, F., His, I., Jauneau, A., Vernhettes, S., Canut, H. y Hofte, H. (1998). A plasma membrane-bound putative endo-1,4-beta-D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in *Arabidopsis*. *Embo J* **17**, 5563-5576.
- Niehaus, K. y Becker, A. (1998). The role of microbial surface polysaccharides in the *Rhizobium*-legume interaction. *Subcell Biochem* **29**, 73-116.
- Nobles, D. R., Romanovicz, D. K. y Brown, R. M., Jr. (2001). Cellulose in cyanobacteria. Origin of vascular plant cellulose synthase? *Plant Physiol* **127**, 529-542.
- Nutman, P. S. (1956). The influence of the legume in root nodule symbiosis: a comparative study of host determinants. *Biol Rev Camb Philos Soc* **31**, 109-151.
- O'Gara, F. y Shanmugam, K. T. (1976). Regulation of nitrogen fixation by Rhizobia. Export of fixed N₂ as NH₄. *Biochim Biophys Acta* **437**, 313-321.
- Oldroyd, G. E. y Downie, J. A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 519-546.
- Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R. y Stahl, D. A. (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu Rev Microbiol* **40**, 337-365.
- Paerl, H. W. y Priscu, J. C. (1998). Microbial Phototrophic, Heterotrophic, and Diazotrophic Activities Associated with Aggregates in the Permanent Ice Cover of Lake Bonney, Antarctica. *Microb Ecol* **36**, 221-230.
- Park, Y. W. y Yun, H. D. (1999). Cloning of the *Escherichia coli* endo-1,4-D-glucanase gene and identification of its product. *Mol Gen Genet* **261**, 236-241.
- Park, Y. W., Tominaga, R., Sugiyama, J., Furuta, Y., Tanimoto, E., Samejima, M., Sakai, F. y Hayashi, T. (2003). Enhancement of growth by expression of poplar cellulase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **33**, 1099-1106.
- Pascual, J., Macian, M. C., Arahall, D. R., Garay, E. y Pujalte, M. J. (2010). Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 154-165.

- Payne, G. W., Vandamme, P., Morgan, S. H., Lipuma, J. J., Coenye, T., Weightman, A. J., Jones, T. H. y Mahenthiralingam, E. (2005). Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Appl Environ Microbiol* **71**, 3917-3927.
- Peng, L., Kawagoe, Y., Hogan, P. y Delmer, D. (2002). Sitosterol-beta-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. *Science* **295**, 147-150.
- Pérez, A. M. (1999). Producción, purificación y caracterización molecular de las celulasas de *Rhizobium leguminosarum*. In *Dpto de Microbiología y Genética*. Salamanca: Universidad de Salamanca.
- Perret, X., Staehelin, C. y Broughton, W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 180-201.
- Peters, G. y Meeks, J. (1989). The *Azolla-Anabaena* symbiosis: basic biology. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**, 193-210.
- Petersen, K. D., Christensen, H., Bisgaard, M. y Olsen, J. E. (2001). Genetic diversity of *Pasteurella multocida* fowl cholera isolates as demonstrated by ribotyping and 16S rRNA and partial *atpD* sequence comparisons. *Microbiology* **147**, 2739-2748.
- Plazinski, J. y Rolfe, B. G. (1985). Analysis of the pectolytic activity of *Rhizobium* and *Azospirillum* strains isolated from *Trifolium repens*. *J Plant Physiol* **120**, 181-187.
- Pombert, J. F., Sistek, V., Boissinot, M. y Frenette, M. (2009). Evolutionary relationships among salivarius streptococci as inferred from multilocus phylogenies based on 16S rRNA-encoding, *recA*, *secA*, and *secY* gene sequences. *BMC Microbiol* **9**, 232.
- Quan, Z. X., Bae, H. S., Baek, J. H., Chen, W. F., Im, W. T. y Lee, S. T. (2005). *Rhizobium daejeonense* sp. nov. isolated from a cyanide treatment bioreactor. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2543-2549.
- Ramírez-Bahena, M. H., García-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J. M., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. y Velázquez, E. (2008). Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 2484-2490.
- Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., Fernández-Santos, F., Peix, A., Martínez-Molina, E. y Mateos, P. F. (2009). Phenotypic, genotypic, and symbiotic diversities in strains nodulating clover in different soils in Spain. *Can J Microbiol* **55**, 1207-1216.
- Ramu, S. K., Peng, H. M. y Cook, D. R. (2002). Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene *ripl* in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 522-528.
- Rapp, P. y Beermann, A. (1991). *Bacterial cellulases*, p. 535-397. En *Biosynthesis and biodegradation of cellulose*: Marcel Dekker, Inc. New York (USA)
- Rasmussen, U., Johansson, C. y Bergman, B. (1994). Early communication in the *Gunnera-Nostoc* symbiosis: plant induced cell differentiation and protein synthesis in the cyanobacterium. *Mol Plant-Microbe Interact* **7**, 696-702.
- Reinhold-Hurek, B., Maes, T., Gemmer, S., Van Montagu, M. y Hurek, T. (2006). An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 181-188.
- Ridge, R. W. y Rolfe, B. G. (1985). *Rhizobium* sp. Degradation of Legume Root Hair Cell Wall at the Site of Infection Thread Origin. *Appl Environ Microbiol* **50**, 717-720.
- Rinaudi, L., Fujishige, N. A., Hirsch, A. M., Banchio, E., Zorreguieta, A. y Giordano, W. (2006). Effects of nutritional and environmental conditions on *Sinorhizobium meliloti* biofilm formation. *Res Microbiol* **157**, 867-875.
- Rivas, R., Velázquez, E., Valverde, A., Mateos, P. F. y Martínez-Molina, E. (2001). A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis* **22**, 1086-1089.
- Rivas, R., Velázquez, E., Willems, A., Vizcaino, N., Subba-Rao, N. S., Mateos, P. F., Gillis, M., Dazzo, F. B. y Martínez-Molina, E. (2002). A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) druce. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5217-5222.

- Rivas, R., Willems, A., Palomo, J. L., Garcia-Benavides, P., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Gillis, M. y Velázquez, E. (2004). *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1271-1275.
- Rivas, R., Laranjo, M., Mateos, P. F., Oliveira, S., Martínez-Molina, E. y Velázquez, E. (2007). Strains of *Mesorhizobium amorphae* and *Mesorhizobium tianshanense*, carrying symbiotic genes of common chickpea endosymbiotic species, constitute a novel biovar (ciceri) capable of nodulating *Cicer arietinum*. *Lett Appl Microbiol* **44**, 412-418.
- Roberts, D. P., Denny, T. P. y Schell, M. A. (1988). Cloning of the *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. *J Bacteriol* **170**, 1445-1451.
- Robertson, J. G. y Lyttleton, P. (1984). Division of peribacteroid membranes in root nodules of white clover. *J Cell Sci* **69**, 147-157.
- Robledo, M., Jiménez-Zurdo, J. I., Velázquez, E., Trujillo, M. E., Zurdo-Piñeiro, J. L., Ramírez-Bahena, M. H., Ramos, B., Díaz-Minguez, J. M., Dazzo, F., Martínez-Molina, E. y Mateos, P. F. (2008). *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7064-7069.
- Rodríguez, H., de Las Rivas, B. y Muñoz, R. (2007). Efficacy of *recA* gene sequence analysis in the identification and discrimination of *Lactobacillus hilgardii* strains isolated from stuck wine fermentations. *Int J Food Microbiol* **115**, 70-78.
- Rolfe, B. G., Gresshoff, P. M. y Shine, J. (1980). Rapid screening method for symbiotic mutants of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii on white clover plants. *Plant Sci Lett* **19**, 277-284.
- Romling, U. (2002). Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res Microbiol* **153**, 205-212.
- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., de Vroom, E., van der Marel, G. A., van Boom, J. H. y Benziman, M. (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325**, 279-281.
- Ross, P., Mayer, R. y Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev* **55**, 35-58.
- Rossi, F., Dellaglio, F. y Torriani, S. (2006). Evaluation of *recA* gene as a phylogenetic marker in the classification of dairy propionibacteria. *Syst Appl Microbiol* **29**, 463-469.
- Royal Horticultural Society, G. B. (1966). *R.H.S. colour chart*. London.
- Rubio, M. C., James, E. K., Clemente, M. R., Bucciarelli, B., Fedorova, M., Vance, C. P. y Becana, M. (2004). Localization of superoxide dismutases and hydrogen peroxide in legume root nodules. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 1294-1305.
- Sahlman, K. (1963). An Electron Microscope Study of Root-Hair Infection by *Rhizobium*. *J Gen Microbiol* **33**, 425-427.
- Saile, E., McGarvey, J. A., Schell, M. A. y Denny, T. P. (1997). Role of Extracellular Polysaccharide and Endoglucanase in Root Invasion and Colonization of Tomato Plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* **87**, 1264-1271.
- Saitou, N. y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- Salzwedel, J. L. y Dazzo, F. B. (1993). pSym *nod* gene influence on elicitation of peroxidase activity from white clover and pea roots by rhizobia and their cell-free supernatants. *Mol Plant Microbe Interact* **6**, 127-134.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. edn. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Santillana, N., Ramírez-Bahena, M. H., García-Fraile, P., Velázquez, E. y Zuniga, D. (2008). Phylogenetic diversity based on *rrs*, *atpD*, *recA* genes and 16S-23S intergenic sequence analyses of rhizobial strains isolated from *Vicia faba* and *Pisum sativum* in Peru. *Arch Microbiol* **189**, 239-247.
- Santos, R., Herouart, D., Sigaud, S., Touati, D. y Puppo, A. (2001). Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 86-89.
- Sawada, H., Kuykendall, L. D. y Young, J. M. (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J Gen Appl Microbiol* **49**, 155-179.
- Saxena, I. M., Kudlicka, K., Okuda, K. y Brown, R. M., Jr. (1994). Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon (*acs* operon) of *Acetobacter xylinum*: implications for cellulose crystallization. *J Bacteriol* **176**, 5735-5752.

- Schafer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. y Puhler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69-73.
- Scheres, B., van Engelen, F., van der Knaap, E., van de Wiel, C., van Kammen, A. y Bisseling, T. (1990). Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell* **2**, 687-700.
- Schmeisser, C., Liesegang, H., Krysciak, D., Bakkou, N., Le Quere, A., Wollherr, A., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Pommerening-Roser, A., Flores, M., Palacios, R., Brenner, S., Gottschalk, G., Schmitz, R. A., Broughton, W. J., Perret, X., Strittmatter, A. W. y Streit, W. R. (2009). *Rhizobium sp.* strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. *Appl Environ Microbiol* **75**, 4035-4045.
- Scholz, H. C., Al Dahouk, S., Tomaso, H., Neubauer, H., Witte, A., Schlöter, M., Kampfer, P., Falsen, E., Pfeffer, M. y Engel, M. (2008). Genetic diversity and phylogenetic relationships of bacteria belonging to the *Ochrobactrum-Brucella* group by *recA* and 16S rRNA gene-based comparative sequence analysis. *Syst Appl Microbiol* **31**, 1-16.
- Sepe, A., Barbieri, P., Peduzzi, R. y Demarta, A. (2008). Evaluation of *recA* sequencing for the classification of *Aeromonas* strains at the genotype level. *Lett Appl Microbiol* **46**, 439-444.
- Shaw, S. L., Dumais, J. y Long, S. R. (2000). Cell surface expansion in polarly growing root hairs of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **124**, 959-970.
- Shaw, S. L. y Long, S. R. (2003). Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells. *Plant Physiol* **131**, 976-984.
- Simoes, T. H., Goncalves, E. R., Rosato, Y. B. y Mehta, A. (2007). Differentiation of *Xanthomonas* species by PCR-RFLP of *rfpB* and *atpD* genes. *FEMS Microbiol Lett* **271**, 33-39.
- Simon, L. D., Randolph, B., Irwin, N. y Binkowski, G. (1983). Stabilization of proteins by a bacteriophage T4 gene cloned in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 2059-2062.
- Slater, S. C., Goldman, B. S., Goodner, B., Setubal, J. C., Farrand, S. K., et al. (2009). Genome sequences of three agrobacterium biovars help elucidate the evolution of multichromosome genomes in bacteria. *J Bacteriol* **191**, 2501-2511.
- Smit, G., Kijne, J. W. y Lugtenberg, B. J. (1987). Involvement of both cellulose fibrils and a Ca²⁺-dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *J Bacteriol* **169**, 4294-4301.
- Smit, G., Logman, T. J., Boerrigter, M. E., Kijne, J. W. y Lugtenberg, B. J. (1989). Purification and partial characterization of the *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae Ca²⁺-dependent adhesin, which mediates the first step in attachment of cells of the family *Rhizobiaceae* to plant root hair tips. *J Bacteriol* **171**, 4054-4062.
- Smit, G., Swart, S., Lugtenberg, B. J. y Kijne, J. W. (1992). Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Mol Microbiol* **6**, 2897-2903.
- Soto, M. J., Sanjuan, J. y Olivares, J. (2006). Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology* **152**, 3167-3174.
- Soto, M. J., Dominguez-Ferrerias, A., Perez-Mendoza, D., Sanjuan, J. y Olivares, J. (2009). Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cell Microbiol* **11**, 381-388.
- Spaank, H. P. (2002). Plant-microbe interactions: a receptor in symbiotic dialogue. *Nature* **417**, 910-911.
- Sprent, J. I. (2001). Nodulation in legumes. En *Royal Botanic Gardens*. Editado por Kew. UK.
- Sprent, J. I. (2007). Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytol* **174**, 11-25.
- Stacey, G., McAlvin, C. B., Kim, S. Y., Olivares, J. y Soto, M. J. (2006). Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **141**, 1473-1481.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kampfer, P., Maiden, M. C., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Truper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C. y Whitman, W. B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1043-1047.
- Studier, F. W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* **219**, 37-44.

- Subba-Rao, N. S., Mateos, P. F., Baker, D., Pankratz, H. S., Palma, J. y Dazzo, F. B. (1995). The unique root-nodule symbiosis between *Rhizobium* and the aquatic legume, *Neptunia natans* (L. f.) druce. *Planta* **196**, 311-320.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. y Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.
- Teel, G. D. y Torrie, J. H. (1985). *Bioestadística: Principios y procedimientos*. Bogotá: MacGraw-Hill
- Tellstrom, V., Usadel, B., Thimm, O., Stitt, M., Kuster, H. y Niehaus, K. (2007). The lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* suppresses defense-associated gene expression in cell cultures of the host plant *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **143**, 825-837.
- Theisen, M., Rioux, C. R. y Potter, A. A. (1993). Molecular cloning, nucleotide sequence, and characterization of *lppB*, encoding an antigenic 40-kilodalton lipoprotein of *Haemophilus somnus*. *Infect Immun* **61**, 1793-1798.
- Thompson, C. C., Thompson, F. L., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Dawyndt, P. y Swings, J. (2004). Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 919-924.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882.
- Timmers, A. C., Auriac, M. C. y Truchet, G. (1999). Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* **126**, 3617-3628.
- Trinick, M. J. (1979). Structure of nitrogen-fixing nodules formed by *Rhizobium* on roots of *Parasponia andersonii* Planch. *Can J Microbiol* **25**, 565-578.
- Turgeon, B. G. y Bauer, W. D. (1985). Ultrastructure of infection-threads development during the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. *Planta* **163**, 328-349.
- Ubezio, P. y Civoli, F. (1994). Flow cytometric detection of hydrogen peroxide production induced by doxorubicin in cancer cells. *Free Radic Biol Med* **16**, 509-516.
- UNESCO (2007). UNESCO-SCOPE Policy Brief: Human alteration of the nitrogen cycle - Threats, benefits and opportunities (2007).
- Urzúa, H. (2005). Beneficios de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile. *Cien Inv Agr* **32**, 133-150.
- Valverde, A., Igual, J. M., Peix, A., Cervantes, E. y Velázquez, E. (2006). *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 2631-2637.
- van Berkum, P., Beyene, D., Bao, G., Campbell, T. A. y Eardly, B. D. (1998). *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 1**, 13-22.
- Van de Velde, W., Zehirov, G., Szatmari, A., Debreczeny, M., Ishihara, H., Kevei, Z., Farkas, A., Mikulass, K., Nagy, A., Tiricz, H., Satiat-Jeuemaitre, B., Alunni, B., Bourge, M., Kucho, K., Abe, M., Kereszt, A., Maroti, G., Uchiumi, T., Kondorosi, E. y Mergaert, P. (2010). Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science* **327**, 1122-1126.
- van Dillewijn, P., Soto, M. J., Villadas, P. J. y Toro, N. (2001). Construction and environmental release of a *Sinorhizobium meliloti* strain genetically modified to be more competitive for alfalfa nodulation. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3860-3865.
- Van Rossum, D., Schuurmans, F. P., Gillis, M., Muyotcha, A., Van Verseveld, H. W., Stouthamer, A. H. y Boogerd, F. C. (1995). Genetic and phenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1599-1609.
- van Spronsen, P. C., Bakhuizen, R., van Brussel, A. A. y Kijne, J. W. (1994). Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. *Eur J Cell Biol* **64**, 88-94.
- van Workum, W. A. T., van Slageren, A. A. N., van Brussel, A. A. y Kijne, J. W. (1994). Role of exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* as host plant-specific molecules required for infection thread formation during nodulation of *Vicia sativa*. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 1233-1241.
- Vance, C. P. (1983). *Rhizobium* infection and nodulation: a beneficial plant disease? *Annu Rev Microbiol* **37**, 399-424.

- Vance, C. P. (2001). Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiol* **127**, 390-397.
- Vasse, J., Debilly, F. y Truchet, G. (1993). Abortion of infection during the *Rhizobium-meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant Journal* **4**, 555-566.
- Velázquez, E., Palomo, J. L., Rivas, R., Guerra, H., Peix, A., Trujillo, M. E., García-Benavides, P., Mateos, P. F., Wabiko, H. y Martínez-Molina, E. (2010). Analysis of core genes supports the reclassification of strains *Agrobacterium radiobacter* K84 and *Agrobacterium tumefaciens* AKE10 into the species *Rhizobium rhizogenes*. *Syst Appl Microbiol* **33**, 247-251.
- Verma, D. P. S., Zogbi, V. y Bal, A. K. (1978). A cooperative action of plant and *Rhizobium* to dissolve the host cell wall during development of root nodule symbiosis. *Plant Science Lett* **13**, 137-142.
- Vincent, J. M. (1970). *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific.
- Vinuesa, P., Silva, C., Lorite, M. J., Izaguirre-Mayoral, M. L., Bedmar, E. J. y Martínez-Romero, E. (2005). Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. *Syst Appl Microbiol* **28**, 702-716.
- Vitousek, P. M., DAbber, J., Howarth, R. W., Likens, G. E., Matson, P. A., Schindler, D. W., Schlesinger, W. H. y Tilman, D. G. (1997). Human alteration of the global nitrogen cycle: causes and consequences. *Ecological Applications* **7**, 737-750
- Waffenschmidt, S. y Jaenicke, L. (1987). Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2,2'-bicinchoninate. *Anal Biochem* **165**, 337-340.
- Wais, R. J., Keating, D. H. y Long, S. R. (2002). Structure-function analysis of nod factor-induced root hair calcium spiking in *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Physiol* **129**, 211-224.
- Walker, D., Reeves, P. y Salmond, G. (1994). The major secreted cellulase, CelV, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* is an important soft-rot virulence factor *Molecular Plant-Microbe Interactions* **425-431** **7**, 425-431.
- Wang, D., Griffiths, J., Starker, C., Fedorova, E., Limpens, E., Ivanov, S., Bisseling, T. y Long, S. (2010). A nodule-specific protein secretory pathway required for nitrogen-fixing symbiosis. *Science* **327**, 1126-1129.
- Wang, E. T., Rogel, M. A., Garcia-de los Santos, A., Martínez-Romero, J., Cevallos, M. A. y Martínez-Romero, E. (1999). *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 4**, 1479-1491.
- Wang, Z., Long, M., Liu, Y., Zhang, F., Xu, L., Zhu, T. y Jiang, S. (2001). Studies on transference of hydrogenase genes of *Rhizobium arachis*. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **41**, 421-426.
- Wayne, L., Brenner, D., Colwell, R., Grimont, P., Kandler, O., Krichevsky, M., Moore, L., Moore, W., Murray, R., Stackebrandt, E., Starr, M. y Trüper, H. (1987). Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 463- 464.
- Wei, G. H., Tan, Z. Y., Zhu, M. E., Wang, E. T., Han, S. Z. y Chen, W. X. (2003). Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1575-1583.
- Weng, F. Y., Chiou, C. S., Lin, P. H. y Yang, S. S. (2009). Application of *recA* and *rpoB* sequence analysis on phylogeny and molecular identification of *Geobacillus* species. *J Appl Microbiol* **107**, 452-464.
- White, A. P., Gibson, D. L., Collinson, S. K., Banser, P. A. y Kay, W. W. (2003). Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *J Bacteriol* **185**, 5398-5407.
- Willems, A., Fernandez-Lopez, M., Munoz-Adelantado, E., Goris, J., De Vos, P., Martínez-Romero, E., Toro, N. y Gillis, M. (2003). Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an opinion. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1207-1217.
- Williams, A., Wilkinson, A., Krehenbrink, M., Russo, D. M., Zorreguieta, A. y Downie, J. A. (2008). Glucomannan-mediated attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs is required for competitive nodule infection. *J Bacteriol* **190**, 4706-4715.
- Woese, C. R., Stackebrandt, E., Weisburg, W. G., Paster, B. J., Madigan, M. T., Fowler, V. J., Hahn, C. M., Blanz, P., Gupta, R., Nealson, K. H. y Fox, G. E. (1984). The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. *Syst Appl Microbiol* **5**, 315-326.

- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**, 221-271.
- Wong, H. C., Fear, A. L., Calhoon, R. D., Eichinger, G. H., Mayer, R., Amikam, D., Benziman, M., Gelfand, D. H., Meade, J. H., Emerick, A. W. y et al. (1990). Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 8130-8134.
- Yanni, Y., Rizk, R., Corich, V., Squartini, A., Ninke, K., Philip-Hollingsworth, S., Orgambide, G., de Bruijn, F., Stoltzfus, J., Buckley, D., Schmidt, T., Mateos, P., Ladha, J. y Dazzo, F. (1997). Natural Endophytic Association between *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii and Rice roots and Assesment of Its Potential to Promote Rice Growth. . *Plant and Soil* **194**, 99-114.
- Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martinez-Romero, E., Kerr, A. y Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 89-103.
- Young, J. M. (2003). The genus name *Ensifer Casida* 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination "*Sinorhizobium adhaerens*" (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 2107-2110.
- Young, J. M. y Park, D. C. (2007). Relationships of plant pathogenic enterobacteria based on partial *atpD*, *carA*, and *recA* as individual and concatenated nucleotide and peptide sequences. *Syst Appl Microbiol* **30**, 343-354.
- Young, J. P., Crossman, L. C., Johnston, A. W., Thomson, N. R., Ghazoui, Z. F., et al. (2006). The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol* **7**, R34.
- Zevenhuizen, L. P., Bertocchi, C. y van Neerven, A. R. (1986). Congo red absorption and cellulose synthesis by *Rhizobiaceae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **52**, 381-386.
- Zurdo-Pineiro, J. L., García-Fraile, P., Rivas, R., Peix, A., León-Barrios, M., Willems, A., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Velázquez, E. y van Berkum, P. (2009). Rhizobia from Lanzarote, the Canary Islands, that nodulate *Phaseolus vulgaris* have characteristics in common with *Sinorhizobium meliloti* isolates from mainland Spain. *Appl Environ Microbiol* **75**, 2354-2359.

