UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

INSTITUTO HISPANOLUSO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

COLONIZACIÓN, INFECCIÓN Y NODULACIÓN EN LA INTERACCIÓN MUTUALISTA *Ensifer – Medicago*: ANÁLISIS MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LA IMPLICACIÓN DEL GEN *celC*

Memoria presentada por
ESTHER MENÉNDEZ GUTIÉRREZ
para optar al
GRADO de DOCTOR por la UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Fdo. Esther Menéndez Gutiérrez

D. PEDRO F. MATEOS GONZÁLEZ, PROFESOR TITULAR DEL ÁREA DE MICROBIOLOGÍA, Y D. RAÚL RIVAS GONZÁLEZ, PROFESOR TITULAR DEL ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

AUTORIZAN:

La presentación y la defensa de la Tesis Doctoral titulada: "COLONIZACIÓN, INFECCIÓN Y NODULACIÓN EN LA INTERACCIÓN MUTUALISTA *Ensifer-Medicago*: ANÁLISIS MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LA IMPLICACIÓN DEL GEN *celC*", elaborada por Esther Menéndez Gutiérrez y realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, para la obtención del grado de DOCTOR

Y para que conste, extendemos la presente autorización en Salamanca, a 4 de Julio de 2014

Fdo. Dr. D. Pedro F. Mateos González Fdo. Dr. D. Raúl Rivas González

A mis abuelos

A mis padres

A Marcos

A la ciencia

A la paciencia

"Lejos de abatirse el investigador novicio ante las grandes autoridades de la Ciencia, debe saber que su destino, por ley cruel, pero ineludible, es crecer un poco a costa de la reputación de las mismas"

Santiago Ramón y Cajal

"La ciencia es más que un simple conjunto de conocimientos: es una manera de pensar"

Carl Sagan

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco la oportunidad ofrecida por el Dr. D. Pedro Mateos González, quien confió en mi para llevar a cabo esta tesis doctoral desde un primer momento, sin conocer nada de mi persona o de mis cualidades. Ésta confianza ciega, sus enseñanzas y su ejemplo han sido claves en mi desarrollo tanto profesional como personal. También, agradezco al Dr. D. Raúl Rivas González su apoyo incondicional, la confianza que tiene depositada en mi, su didáctica y su "guadaña roja", eres un luchador y un perfecto ejemplo de como la juventud no va reñida con la experiencia y el buen hacer. A ambos, director y codirector, millones de gracias, tenéis mi admiración y respeto para siempre.

Agradezco al Catedrático Eustoquio Martínez Molina y a la Dra Dª Encarna Velázquez por las buenas enseñanzas, consejos y buenas palabras, el buen humor, los chascarrillos al "azahar" y los telares (de León por supuesto).

I cannot express with words my gratitude to Professor Rebecca Dickstein at UNT (US) and Dr. Jeremy Murray at JIC (UK). You both make my short stays there, even the first awful days. Hope we can meet again someday, both of you and myself.

Becca, thanks a million for everything, for sharing your knowledge and for your friendship. Thanks for teaching me about NIP/LATD mutants and for showing me great and useful techniques. I will always follow your example and I will always remember our fantastic time together. Also, I want to thank Lon and the people in your lab in that moment, Sarah, Rammyani, Salehin, Leon and Alexis, for being there, for sharing laughs, shopping days and potlucks, thanks a million, miss y´all. Becca and Lon, I´m looking forward to dance with you both, Celtic style!

Jeremy, I think you are the best young researcher I´ve ever met. I hope you will have success in everything you try. Thanks for guiding me along signalling and infection, like rhizobia through infection threads (LOL) and for allowing me to join the Infection Group. I want to thank your people: Andy, Chengwu, Kirsty, Donna and specially, the smartest baby-scientist girl ever, "mi amiga" Sonalita, I miss you all!

Also, I want to thank everyone in Oldroyd lab for the advices and the scientific support, as well as the great time I have there with you all. Specially, I´m grateful to Professor Allan Downie for open my eyes and look further in science.

Finally, but not less important, thanks a million everybody in Norwich: Aza and Tobin, Antonio, Alborcito, Livia, Sonalita (again!), Eva, mi reencontrada Paula, Yoselin (thanks for trusting me, I´m sure we will get it soon, one way or another!!!)… I miss you all everyday, de verdad de la buena!.

Sigo agradeciendo en castellano, ahora viene el turno de mis compañeros de Máster y del CIALE, a los que no están ya y a los que aún se quedan un ratito más. Cuando pienso en el CIALE pienso en las horas de la

comida y los temas de actualidad y no de tan actualidad, las escapadas al Doña Brígida, las charlas y cotilleos de pasillo, el invernadero (Tomás, que haríamos sin ti!), la máquina de café con sorpresas, la curiosa manera de encender las luces del laboratorio, las carreras por las rampas…en general, en el buen humor y las risas… y a veces me teletransporto. Marta (Granada), Anna, Marta (Martuli), Waltersito, Joni, Lucho, Thais… y a todos en general (espero que me perdoneis si no nombro a todos). Ahora en portugués, obrigada minha querida Clarisse, adorei o teu estagio no meu laboratório no CIALE e agora estou orgulhosa de ter voçê como amiga, muitos beijinhos e lembranças.

Quiero agradecer a la gente del IRNA, en especial a Helena, Álvaro, Mariano y Sergio, por el apoyo técnico y moral, por ser como son, por los ratos compartidos, por entenderme siempre… por todo en general.

Quiero agradecer a los compañeros de lucha becaria-precaria, a esos jóvenes investigadores e investigadoras que luchan día a día por mejorar nuestras condiciones de trabajo y por una carrera investigadora digna a todos los niveles. Quiero hacer extensivo el agradecimiento a las futuras generaciones de Innovian@s, por lo que aún no han conseguido, pero que sin duda conseguirán.

Agradecer a toda la gente que trabaja en el Departamental, a esas personas que hacen que trabajar allí sea más fácil y maravilloso. También quiero agradecer a los que ya no están, siempre queda algo de ellos, incluso se siente en el ambiente, en especial a Paula (gracias por ser tú, de nuevo), que ahora mismo está de nuevo con nosotros y trae compañía, un niño precioso y eléctrico. También quiero dar las gracias a Marta Robledo, porque de los hilos de su tesis tiré, dando lugar a un trabajo del que estoy plenamente satisfecha, pronto cerraremos alguna caseta, esta vez, las dos como doctoras. Además, no me quiero olvidar de Pepín, de Jose Manuel "el priiimo", Rebe (aunque a vosotros os incluyo también dentro de la pandi), Rebeca y Daniel Mulas…y de muchos otros que han formado parte de este tiempo.

Quién me falta, no sé no sé… Muchisisímas gracias al laboratorio más dicharachero y farandulero del mundo mundial!!! El día que me marche lloraré a mares, si consigo librarme de las cadenas y la jaula que parece ser que me van a encargar, eso si, a medida con comedero, túneles y bañerita, para que no me falte de nada, jajaja! En serio sois lo mejor, las risas, la repanocha, la bomba, sois GENIALES! No se si os pasa, pero cada vez que me acuerdo de los vídeos locos, de los disfraces, de los cumpleaños, de las canciones y performances varias, de las escapadas, de las shopping nights, de las salidas nocturnas y las "despedidas de soltera a lo espartano", de los congresos, en especial del congreso en Girona (el despiporre en todos los sentidos, científico también ehhh???), los karaokes, los spoilers de Game of Thrones y Breaking Baaaaad, las confrontaciones charro-leonesas-andaluzas y Garrido-Pizarrales-otros barrios charros… me sale una sonrisa, a veces carcajada, que hace que se me olviden todos los malos rollos que puedan

ensombrecer el día a día, como si de una "laboraterapia" se tratase. Vosotros sabéis que os adoro a todos, no me importa vuestra "raza", edad o si sois los que más cobráis (jujuju) o no cobráis nada porque sois todavía alumnitos (jijiji), os quiero mucho de verdad, aunque a veces me haga la sorda, esté taponada o no me conste. Por último quisiera decir a Mariloli, Mariconchi y Maricosi, que tengáis claro que las de Micro…NO son tontas!!! Y que *Micromonospora* NO fija Nitrógeno, pero esa es otra historia de las muchas que todos recordaremos y contaremos a nuestros descendientes, que seguro serán microbiólog@s y les gustarán los delfines, los caballos, los conejos, el jamón, las frikadas, la cerveza, el vino… pero las perrunillas, el huevo y el membrillo, no, eso no.

Además, agradezco al destino porque aquí en Salamanca encontré personas maravillosas, personas especiales que se han convertido en amigos, como si lo hubiesen sido toda mi vida. Gaby, Pame y Ana María, millones de gracias por ser como sois, por los momentos compartidos, por acercarnos vuestras culturas y por ser "familia" para Marcos y para mí.

Agradecer, por último y no menos importante, a mis mejores amigas de siempre y para siempre: Elena y familia, en especial a la nena más preciosa del mundo, Marina), Raquel y familia, que son como la mía propia, a mis amigos y amigas, la mayoría lejos pero a su vez cerca, a toda mi familia, a mi familia política, a mis hermanas, a mis abuelos, os quiero infinito y os doy las gracias, en especial a los que me dieron la vida y me enseñaron y me hicieron lo que soy, fuere de la manera que fuere, porque me quieren y les quiero. Finalmente quiero agradecer a Marcos todo este tiempo juntos y el que vendrá, porque me completas, me haces reír, me calmas, me escuchas, me aguantas… porque las penas son menos penas y las alegrías son mas alegrías si tú estás a mi lado, porque te quiero, porque me quieres, porque nos queremos.

En definitiva, millones de gracias a todas y cada una de las personas que hacen felices mis días, que me enseñan lo bonito que es vivir, que me hacen querer ser mejor y que, de una u otra manera, forman parte de este período de mi vida.

Esta tesis doctoral ha sido financiada por los siguientes proyectos:

- **AGL2008-03360**. **MICINN**. *Rhizobium* as microbial delivery system in agriculture. IP: Dr. Pedro F. Mateos González
- **SA306A11-2. JCyL**. Expresión heteróloga y análisis funcional de la celulasa bacteriana CelC2 en el sistema simbiótico modelo *Sinorhozobium-Medicago*. IP: Dr. Eustoquio Martínez-Molina
- **AGL2011-29227**. **MINECO**. Papel funcional de *Rhizobium* en el diseño de biofertilizantes bacterianos. IP: Dr.Raúl Rivas González

Para la realización de este trabajo se concedió una Ayuda de Formación de Personal Investigador (**BES-2009-022401**) asociada al proyecto AGL2008-03360 y un contrato de Personal Investigador asociado al proyecto AGL2011-29227.

Además, dos estancias breves de tres meses cada una de duración fueron concedidas en 2011 en University of North Texas, USA (**EEBB-2011-44487**) y en 2012 en John Innes Centre, UK (**EEBB-I12-05477**), ambas asociadas al proyecto AGL2008-03360.

ÍNDICES

Índices

1. Índice de contenidos III

2. Índice de figuras XII

3. Índice de tablas XXIX

5. Abreviaturas y símbolos

---

1. Índice de contenidos

INTRODUCCIÓN

1. La necesidad mundial de una agricultura sostenible y eficiente 3

2. Problemática del uso de fertilizantes químicos 4

3. Beneficios de las interacciones mutualistas planta-microorganismo 6

4. Retos científicos en la optimización de las relaciones planta-microorganismo 7

5. Simbiosis fijadora de Nitrógeno 12

5. 1 Clasificación taxonómica: La familia Rhizobiaceae 13

5. 1. 1 El género *Rhizobium* 19

5. 1. 2 El género *Ensifer* 20

5. 2 La familia Fabaceae 22

5. 2. 1 El género *Trifolium* 25

5. 2. 2 El género *Medicago* 26

6. Interacción molecular Rhizobia-leguminosa 28

6. 1 Dialogo y señalización molecular 30

6. 2 Adhesión y colonización bacteriana 33

6. 3 Modos de infección 34

6. 3. 1 Curvatura y degradación del ápice del pelo radical (Infección primaria) 35

6. 3. 2 Formación y elongación del canal de infección 37

6. 3. 3 Liberación en el interior del nódulo y formación

de simbiosomas (Infección secundaria) 38

6. 3. 4 Diferenciación en bacteroides y Fijación de Nitrógeno 39

6. 4 Desarrollo nodular 39

6. 4. 1 Tipos de nódulos 40

6. 4. 2 Partes de un nódulo indeterminado 41

7. Especificidad y reacciones de defensa en el proceso simbiótico 42

7. 1 Especificidad de hospedador 42

7. 2 Reacciones de defensa durante la infección rizobiana 43

8. Enzimas degradativos de la pared celular vegetal implicadas en biosíntesis 45

8. 1 Celulasas bacterianas y pectinasas vegetales 45

8. 2 Implicación de la celulasa CelC2 en la colonización, la infección primaria y la infección secundaria 46

OBJETIVOS

Objetivos 51

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

1. 1 Cepas bacterianas 55

1. 2 Material vegetal 57

2. Técnicas microbiológicas básicas 58

2. 1 Medios de cultivo rutinarios 58

2. 2 Medios de cultivo para selección de transformantes 58

2. 3 Antibióticos 60

2. 4 Conservación de las cepas bacterianas 61

3. Condiciones y medios utilizados para el cultivo de plantas 61

3. 1 Medios de cultivo para plantas 61

3. 2 Esterilización y germinación de semillas 62

3. 2. 1 Alfalfa y/o trébol 62

3. 2. 2 *Medicago truncatula* 63

4. Ensayos *in planta* 63

4. 1 Ensayos de colonización e infección en placa 63

4. 2 Ensayo para la obtención de pelos radicales de raíces de *Medicago truncatula* 64

4. 3 Ensayos de nodulación en tubo 64

4. 4 Ensayos de transformación de raíces 65

4. 5 Ensayos de invernadero 66

4. 5. 1 Ensayos de producción 66

4. 5. 2 Ensayos de producción de semillas 66

5. Técnicas bioquímicas 67

5. 1 Detección de actividad celulásica 67

5. 1. 1 Detección de actividad celulásica en cultivo celular. Ensayos en placa de doble capa 67

5. 1. 2 Obtención de extractos celulares por sonicación 68

5. 1. 3 Cuantificación de proteína total del extracto sonicado 68

5. 1. 3. 1 Absorbancia 68

5. 1. 3. 2 Método Bradford (BioRad®) 68

5. 1. 4 Detección de actividad celulásica de los extractos celulares. Ensayos en doble capa 69

5. 2 Electroforesis vertical de proteínas (SDS-PAGE) 69

5. 2. 1 Preparación de la membrana de celulosa en soporte GelBond (Sigma®) 69

5. 2. 2 Preparación de geles de poliacrilamida 70

5. 2. 3 Preparación de la muestra para electroforesis vertical 71

5. 2. 4 Electroforesis vertical 71

5. 3 Cuantificación de actividad celulolítica. Valoración de grupos reductores o BCA 72

5. 3. 1 Preparación de muestras enzimáticas para BCA 72

5. 3. 2 Reacción de valoración de grupos reductores 72

5. 4 Purificación de la celulasa CelC2 73

5. 5 Determinación de la producción de celulosa y formación de biofilms 75

5. 5. 1 Determinación cualitativa de la producción de celulosa 75

5. 5. 2 Formación de biofilms in vitro 75

6. Técnicas de inmunohistoquímica 76

6. 1 Producción de anticuerpos policlonales de la celulasa CelC2 76

6. 2 ELISA indirecto 77

6. 3 Western Blot 79

6. 3. 1 Preparación de muestras y cuantificación de proteina total 79

6. 3. 2 Electroforesis de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) 79

6. 3. 3 Preparación de muestras 80

6. 3. 4 Transferencia a membrana de nitrocelulosa 80

6. 3. 5 Revelado de la membrana de nitrocelulosa 82

7. Técnicas de Biología Molecular 83

7. 1 Obtención y cuantificación de ácidos nucleicos 83

7. 1. 1 Extraccion DNA total 83

7. 1. 1. 1 Extracción con NaOH 83

7. 1. 1. 2 Extracción de DNA total por lisado bacteriano 84

7. 1. 1. 3 Extracción de DNA total con kit comercial REDExtract-N-Amp Plant PCR kit (Sigma ®) 84

7. 1. 1. 4 Extracción de DNA total con kit comercial Speedtools Plant DNA Extraction Kit (Biotools®) 85

7. 1. 2 Extraccion DNA plasmídico 85

7. 1. 2. 1 Extraccion DNAp por lisis alcalina 85

7. 1. 2. 2 Extraccion DNAp mediante kit comercial Speedtools Plasmid DNA kit (Biotools®) 87

7. 1. 3 Extracción y limpieza de RNA 88

7. 1. 3. 1 Extracción de RNA total mediante kit comercial Rneasy Mini Kit (Qiagen®) 88

7. 1. 3. 2 Extracción de RNA total en cantidades pequeñas mediante kit comercial Rneasy Micro Kit (Qiagen®) 89

7. 1. 3. 3 Purificación RNA 89

7. 1. 4 Síntesis de DNA complementario (cDNA) 90

7. 2 Amplificación y electroforesis de ácidos nucleicos 91

7. 2. 1 Diseño y síntesis de primers o cebadores 91

7. 2. 2 Amplificación de ácidos nucleicos 93

7. 2. 2. 1 PCR convencional 93

7. 2. 2. 1. 1 REDExtract Ready Master Mix (Sigma®) 93

7. 2. 2. 1. 2 DreamTaq Green Master Mix (Thermo®) 93

7. 2. 2. 2 PCR de colonia 94

7. 2. 2. 3 PCR en gradiente 94

7. 2. 2. 4 RT-PCR (semicuantitativa) 94

7. 2. 2. 5 PCR (qPCR) cuantitativa o a tiempo real 95

7. 2. 3 Electroforesis en gel de agarosa 95

7. 2. 4 Recuperacion de fragmentos a partir de geles de agarosa 97

7. 2. 5 Secuenciación 97

7. 3 Clonaje de fragmentos de interés 97

7.3. 1 Plásmidos y vectores de clonaje 97

7. 3. 2 Clonaje por restricción clásica 101

7. 3. 2. 1 Digestión con enzimas de restricción 101

7. 3. 2. 2 Tratamiento de extremos 102

7. 3. 2. 3 Ligación de vector e inserto 102

7. 3. 3 Clonaje Gateway® (Invitrogen®) 103

7. 4 Transformación de bacterias 103

7. 4. 1 Preparación *E. coli* conpetentes 103

7. 4. 2 Transformación *E. coli* por choque térmico 104

7. 4. 3 Preparación de células competentes y transformación de *Rhizobium (Agrobacterium) rhizogenes* por "*freeze-thaw*" 104

7. 4. 4 Transformación bi/triparental de *Ensifer* 105

8. Técnicas histológicas y microscópicas 106

8. 1 Cortes histológicos de nódulos. Azul de toluidina 106

8. 2 Cortes histológicos de nódulos. Inmunohistoquímica 106

8. 3 Tinción ß-Gal (fusión *lacZ*) en raíces de *Medicago* 107

8. 4 Montaje de muestras para observación al microscopio 107

8. 5 Microscopía óptica 108

8. 6 Microscopía de fluorescencia 108

8. 7 Microscopía confocal 109

9. Tratamiento de datos 108

9. 1 Herramientas infomáticas 108

9. 2 Análisis estadísticos 109

9. 3 Visualización de imágenes 109

9. 4 Bibliografía 109

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1

1. Introducción 115

2. Análisis in silico del operón *celABC* de *Rhizobium* y géneros relacionados 116

2. 1 Análisis a nivel genómico 116

2. 2 Análisis a nivel proteómico e identificación y predicción de dominios 119

3. Identificación de una posible secuencia reguladora de la expresión del gen *celC* localizada en el gen *celB* de *Rhizobium leguminosarum* 122

3. 1 Obtención de fusiones transcripcionales 125

3. 2 Efecto en producción de celulosa y colonización de esta secuencia reguladora 127

3. 3 Localización de la expresión *in planta* 127

4. El operón *celABC* en el género *Ensifer* 130

5. Obtención y caracterización bioquímica de mutantes superproductores de celulasa CelC 2 de *Rhizobium* y su ortólogo CelC en *Ensifer* 131

5. 1 Obtención de cepas transformantes de *Ensifer* que expresan la celulasa CelC2 132

5. 1. 1 Caracterización bioquímica de las cepas 1021C2$^+$ y WSM419C2$^+$ 132

5. 1. 1. 1 Ensayo de difusión en placa 133

5. 1. 1. 2 Electroforesis de geles de poliacrilamida SDS-PAGE y zimograma 133

5. 1. 1. 3 Cuantificación de actividad celulolítica 135

5. 1. 1. 4 Detección mediante Inmunoblot 136

5. 2 Obtención de cepas transformantes de *E. medicae* WSM419 que sobreexpresen su propia celulasa CelC 136

5. 2. 1 Caracterización bioquímica de la cepa transformante WSM419EMC$^+$ 138

5. 2. 1. 1 Ensayo de difusión en placa 139

5. 2. 1. 2 Electroforesis de geles de poliacrilamida SDS-PAGE y zimograma 139

5. 2. 1. 3 Cuantificación de actividad celulolítica 140

CAPÍTULO 2

1. Introducción 145

2. Producción de celulosa y formación de biofilms en el género *Ensifer* 145

2. 1 Producción de celulosa en el género *Ensifer* 145

2. 2 Formación de biofilms en el género *Ensifer* 149

3. Evaluación de la implicación de la superproducción de celulasa CelC2 en la biosíntesis de celulosa y formación de biofilms 150

4. Evaluación de la implicación de la superproducción de celulasa CelC2 en la colonización de superficies radiculares 153

CAPÍTULO 3

1. Introducción 159

2. Implicación de la celulasa CelC2 en infección primaria en *Medicago sativa* 160

3. Implicación de la expresión heteróloga de la celulasa CelC2 en infección primaria en *Trifolium repens* 165

4. Implicación de la celulasa CelC2 en infección primaria en *Medicago truncatula* 168

5. Respuestas de defensa de la planta a la expresión heteróloga de CelC2 171

CAPÍTULO 4

1. Introducción 179

2. Efecto de la expresión hetróloga de la celulasa rizobiana CelC2 en infección secundaria y nodulación en *Medicago* 179

2. 1 Acción de la celulasa CelC2 rizobiana en la nodulación de los sistemas simbióticos *M. sativa-E. meliloti* 1021 y *M. truncatula-E. meliloti* 1021 en ausencia de Nitrógeno 179

2. 1. 1 Cinética de nodulación 179

2. 1. 2 Morfología nodular 180

2. 1. 3 Histología nodular 181

2. 2 Acción de la celulasa CelC2 rizobiana en la nodulación de el sistema simbiótico *M. truncatula-E. meliloti* 1021 en presencia de Nitrógeno 183

2. 2. 1 Morfología nodular 183

2. 2. 2 Histología nodular 184

2. 3 Acción de la celulasa CelC2 rizobiana en la nodulación de el sistema simbiótico *M. truncatula-E. medicae* WSM419 185

2. 3. 1 Cinética de nodulación 186

2. 3. 2 Morfología nodular 186

2. 3. 3 Histología nodular 187

3. Efecto de la sobreexpresión de un ortólogo de la celulasa CelC2 en *Ensifer* en infección secundaria y nodulación de *Medicago truncatula* 189

3. 1 Cinética de nodulación 190

3. 2 Morfología e histología nodular 190

CAPÍTULO 5

1. Introducción 197

2. Desarrollo vegetal en ausencia de Nitrógeno 197

2. 1 Fenotipo presentado por las plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con *E. meliloti* 1021 y su derivado 1021C2$^+$ en ausencia de Nitrógeno 197

2. 2 Fenotipo presentado por las plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con su cepa homóloga *E. medicae* WSM419 y sus derivados WSM419C2$^+$ y WSM419EMC$^+$ en ausencia de Nitrógeno 201

3. Desarrollo vegetal en presencia de Nitrógeno 205

3. 1 Fenotipo presentado por las plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con *E. meliloti* 1021 y su derivado 1021C2$^+$ en presencia de Nitrógeno 205

3. 2 Fenotipo presentado por las plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con su cepa homóloga *E. medicae* WSM419 y sus derivados WSM419C2$^+$ y WSM419EMC$^+$ en presencia de Nitrógeno 208

4. Análisis cuantitativo de elementos esenciales mediante Ionómica 210

CAPÍTULO 6

1. Introducción 217

2. Similitudes en la biosíntesis de celulosa entre plantas y bacterias 217

2. 1 Estudio *in silico* de las similitudes entre las celulosa sintasas CesA de plantas y CelA de bacterias. 218

2. 2 Estudio *in silico* de las similitudes entre las endoglucanasas KORRIGAN de plantas y CelC de bacterias 220

3. Transformación de raíces de *Medicago truncatula* con la celulasa rizobiana CelC2 224

3. 1 Influencia de la celulasa CelC2 en la simbiosis fijadora de Nitrógeno 225

4. Infección primaria 230

5. Infección secundaria y desarrollo del nódulo 230

6. Inmunolocalización de la celulasa CelC2 en el nódulo de raíces transformadas de *Medicago truncatula* 233

7. Efecto de la celulasa CelC2 en iinfección secundaria: transformación de raíces de *Medicago truncatula nip3* 236

8. Influencia de la celulasa CelC2 en la biosíntesis de celulosa vegetal 240

DISCUSIÓN GENERAL

Discusión general 247

CONCLUSIONES

Conclusiones 265

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía 269

THESIS SUMMARY

1. Introduction 303

2. CelC homologies *in silico* analysis 304

3.CelC2 implications in colonization *in vitro* 305

4. Prediction of a putative *celC* promoter 305

5. CelC2/CelC implication in the *Medicago-Ensifer* infection process, nodule and plant development 306

6. CelC2 implications in cellulose biosynthesis *in planta* 310

7. Conclusions 312

- **Figura** 1. Mapa mundial que representa el porcentaje de población malnutrida. Más del 90% de habitantes en estado de malnutrición están en los países subdesarrollados. Según leyenda, los estados coloreados en rojo oscuro son los que sufren mayor porcentaje de desnutrición (Datos FAO, 2013 www.fao.org/hunger/en). pág. 3

- **Figura** 2. El ciclo biogeoquímico del Nitrógeno (Ecoplexity, Portland State University, 2010; http://ecoplexity.org/). pág. 5

- **Figura** 3. El ciclo biogeoquímico del Fósforo (Ecoplexity, Portland State University, 2010; http://ecoplexity.org/) pág. 5

- **Figura** 4. Esquema general de los organismos y microorganismos presentes en la rizosfera (A). Principales funciones e impacto de los microorganismos presentes en la rizosfera (B) (adaptado de Mendes *et al*., 2013). pág. 7

- **Figura** 5. Estreses bióticos y abióticos que afectan a las plantas (adaptado de "How Microbes Can Feed the World", American Academy of Microbiology, 2013). pág. 9

- **Figura** 6. Beneficios de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Weyens *et al*., 2009). pág.10

- **Figura** 7. Agentes biológicos fijadores de Nitrógeno en la agricultura y en los sistemas naturales terrestres (modificado de Herridge *et al*., 2008). pág.12

- **Figura** 8. Morfología de un cultivo en placa de *Rhizobium* (A). Cromosoma (B) y plásmidos (C) de *Rhizobium etli* CFN42, cepa con su replicoma totalmente secuenciado. pág.20

- **Figura** 9. Morfología de las bacterias del género *Ensifer*, en concreto de la cepa *Ensifer medicae* WSM419 (E). Cromosoma (A) y plásmidos (B, C, D), los cuales se encuentran completamente secuenciados (adaptado de Reeve *et al*., 2010). pág.22

- **Figura** 10. Árbol filogenético de la familia Fabaceae, modificado de Gepts *et al*., 2005. pág.23

- **Figura** 11. Diversidad de leguminosas. *Acacia angustissima* (A), *Astragalus lindheimeri* (B), *Desmodium paniculatum* (C), *Trifolium incarnatum* (D), *Sesbania vesicaria* (E), *Strophostyles helvola* (F), *Melilotus officinalis* (G), *Vicia villosa* (H) y *Psoralea hypogaea* (I) (fotografías tomadas de la Samuel Roberts Noble Foundation). pág.24

- **Figura** 12. Leguminosas del género *Trifolium*; esquema de *Trifolium repens* L., con detalle de flores, semillas y vainas (A). Mutaciones en el genoma de la planta pueden influir, por ejemplo, en el número de hojas (trébol de cuatro o cinco hojas) (B). Detalle de la flor de trébol blanco (C) y de un nódulo indeterminado típico fijador (D). pág.25

- **Figura** 13. Género *Medicago*. Esquemas de *Medicago sativa* (A) y *Medicago truncatula* (B), plantas utilizadas en este estudio. Genoma de *Medicago truncatula*, totalmente secuenciado, consta de 8 cromosomas (C). Planta de *M. truncatula* en condiciones de invernadero (D). Detalle de hoja (E), flor (F) y vaina (G) de *M. truncatula*. pág.27

- **Figura** 14. Representación esquemática de las etapas de una interacción simbiótica *Rhizobia* leguminosa (modificado de Oldroyd *et al*., 2011). pág.30

- **Figura** 15. Diversidad de Factores de Nodulación. Los NF normalmente contienen cuatro o cinco residuos de ß(1-4)N-acetilglucosamina. Las diferentes sustituciones en este esqueleto generados por diferentes rizobios y los genes de nodulación que codifican para ellas están indicados en el recuadro (adaptado de Downie, 2010). pág.31

- **Figura** 16. A) Estructura del NF predominante de *E. meliloti*, simbionte de *Medicago truncatula*, que unido al receptor desencadena la ruta simbiótica común en leguminosas del tipo *Lotus japonicus* y *M. truncatula*. B) Señalización molecular posterior a las oscilaciones de calcio (adaptado de Oldroyd, 2013). pág.33

- **Figura** 17. Modelos de infección en leguminosas. De izquierda a derecha, infección intercelular (se cree que es la más antigua evolutivamente hablando), infección por "cracks" o heridas e infección canónica o por pelos radicales. Estas dos últimas son dependientes de Factores de Nodulación (adaptado de Madsen *et al*., 2010). pág. 3

- **Figura** 18. Estructura típica de una raíz. Morfología de los pelos radicales de las zonas I, II y III, antes de la inoculación (A-C, respectivamente). Diagrama de una plántula de *Medicago sativa* (D). Morfología de los pelos radicales post-inoculación según las zonas (E-G) (adaptado de Gage, 2004). pág.35

- **Figura** 19. Representación esquemática de los eventos ocurridos en infección secundaria, desde la liberación de la bacteria al final del canal de infección a la fijación de Nitrógeno llevada a cabo en los simbiosomas (adaptado de Jones *et al*., 2007). pág.38

- **Figura** 20. Tipos de nódulos. A) Esquema de los dos tipos de nódulos encontrados en las leguminosas (adaptado de Buchanan *et al.*, 2010). B)

Nódulo indeterminado de *Medicago sativa.* C) Nódulo determinado de *Phaseolus vulgaris*. pág.40

- **Figura** 21. Estructura de un nódulo indeterminado típico fijador de Nitrógeno. A) Esquema de las zonas en las que se divide el nódulo y eventos producidos en las distintas zonas. En la zona II se produce la llegada del canal de infección (1) y la liberación de las bacterias al interior celular (2), donde comienza su diferenciación (3) hasta que en la zona III, se forman los simbiosomas (4), donde se fijará el Nitrógeno (modificado de Scheres *et al.*, 1990). B) Corte histológico de un nódulo funcional de *Trifolium repens* en el que se diferencian a la perfección las zonas anteriormente descritas (adaptado de Mateos *et al*., 2011). pág.41

- **Figura** 22. Actividad biológica de la celulasa CelC2 de *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843 purificada en pelos radicales de *Trifolium repens*. Las micrografías muestran: A) Pelo sin tramiento enzimático; B) Inicio de la formación del fenotipo HoT; C) Extrusión del protoplasto y liberación a través del orificio formado; D) Orificio final realizado por la celulasa CelC2 en el ápice del pelo por el cual se ha liberado el citoplasma. La integridad de la célula no se ve comprometida, ya que este orificio se realiza de forma muy regulada y localizada (adaptado de Robledo *et al*., 2008). pág.47

- **Figura** 23. Esquema de ensamblaje de partes del sistema Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). pág.81

- **Figura** 24. Marcadores moleculares utilizados en electroforesis en geles de agarosa. Casa comercial Fermentas (Thermo-Fischer). pág.96

- **Figura** 25. Vector de clonaje pGEM-t Easy (Promega). Se detalla el MCS, donde cortan las principales enzimas de restricción. pág.98

- **Figura** 26. Plásmido pBBR1-MCS-2 (Kovach *et al*., 1994). Se detalla el MCS, donde cortan las principales enzimas de restricción. pág.99

- **Figura** 27. Plásmido pk7WG2D.1 (Karimi *et al*., 2002) para recombinaciones Gateway. pág.100

- **Figura** 28. Esquema de las estructuras del operón *celABC* encontrado mediante BLASTn en el género *Rhizobium* y géneros relacionados, bacterias fijadoras en vida libre y otros géneros de bacterias encontradas en nódulos de leguminosas. En verde se representan los similares a *celC* y en rosa los similares a *celA*. En negro se representan proteínas no anotadas aún pero que pueden tener una importancia especial. pág.117

- **Figura** 29. A) Proteínas codificadas por el operón *celABC* con las anotaciones correspondientes a la predicción de dominios proteicos realizados por la aplicación informática InterProScan 5. B) Estructuras tridimensionales predecidas para dichas proteínas realizadas por la aplicación bioinformática Phyre2. Esquemas representados utilizando el software Geneious 4. 8. 4. pág.119

- **Figura** 30. Producción de celulosa de los mutantes por inserción de *R. leguminosarum* bv. trifolii R200 descritos por Ausmees y colaboradores. La imagen muestra un defecto en producción de celulosa (colonias blanquecinas) en R204 y R211 respecto de la cepa silvestre R200. pág.123

- **Figura** 31. Estructura del operón *celABC* (en verde, los genes que lo componen). Se muestran las anotaciones correspondientes a los genes que lo componen, la secuencia de la caja por la que se predice el promotor del operón (naranja), el sitio de unión a factores de transcripción que se encuentra también "*upstream*" del gen *celA* y la secuencia clonada en la fusión transcripcional (gris) que se predice como potencial promotor y/o secuencia reguladora del gen *celC* (verde claro), además de las cajas por la que se predice este promotor/regulador (naranja, dentro del *pcelC*). Obtenido con Geneious 4.8.4. Predicciones de posibles promotores realizadas con BPROM de Softberry. pág.124

- **Figura** 32. Esquema del plásmido pBBpcelCGFP. Se muestran los genes de resistencia a kanamicina (azul cielo), regiones *mob* (gris) y *rep* (amarillo) del plásmido pBBR1MCS-2 y la zona que contiene una GFP (verde) y una secuencia estabilizadora del plásmido pHC125 (azul neón) clonada en los sitios KpnI y SacI. Entre estas dos últimas zonas de la región obtenida del plásmido pHC125, se clonó el fragmento con la posible secuencia reguladora (*pcelC*) entre los sitios de restricción SpeI y XbaI (rosa). pág.125

- **Figura** 33. Secuencia nucleotídica del fragmento para el que se predice una secuencia reguladora clonado en el vector pBBFTGFP, derivado del pBBR1-MCS-2 que contiene un fragmento del plásmido pHC125 que codifica para una GFP. En negrita se resalta la secuencia correspondiente al gen *celB* y subrayados están los 49 nucleótidos iniciales de *celC*; en rojo y en verde se resaltan los primers *forward* y *reverse* utilizados para esta amplificación y que contienen sitios de corte SpeI y XbaI, respectivamente. pág.126

- **Figura** 34. Microfotografía de cultivos puros de las cepas recombinantes ANU843pBBEVGFP (A, B, C) y ANU843pBB*pcelC*GFP (D, E, F). Imágenes tomadas mediante microscopía de fluorescencia; A y D, campo claro; B y E, canal fluorescencia verde; C y F, canales solapados. pág.126

- **Figura** 35. Microfotografías de pelos radiculares de *Trifolium repens* inoculados con la cepa ANU843 que contiene la construcción *pcelC::gfp*. Se muestra la expresión de *pcelC* en curlings (A) y canales de infección (A, B), concidiendo con los lugares de acción de la celulasa CelC2. Las flechas señalan los curlings en el panel A y los canales de infección en el panel B. pág.128

- **Figura** 36. Expresión en nódulos de trébol de la fusión *pcelC::gfp*. La celulasa CelC se está expresando en la zona de infección del nódulo (B, C, D). Además se detecta expresión en los pelos radicales de la base del nódulo, que suelen ser lugares de entrada de rizobios (A, E), así como colonizando superficies celulares y espacios intercelulares (E, F). La expresión de este gen continúa hasta que se forma el simbiosoma, donde el rizobio se ha diferenciado. pág.129

- **Figura** 37. Detección de actividad carboximetilcelulásica en placa de doble capa de los extractos proteicos obtenidos por sonicación de las diferentes cepas. La numeración de la imagen se corresponde por orden a 1) ANU843, 2) ANU843C2$^+$, 3) 1021, 4) 1021C2$^+$, 5) WSM419 y 6) WSM419C2$^+$. pág.133

- **Figura** 38. Separación y detección de isoenzimas mediante SDS-PAGE (A, C) y zimograma (B, D), respectivamente, realizados con los extractos celulares de las cepas a estudio, *E. meliloti* 1021 y 1021C2$^+$ (A, B) y *E. medicae* WSM419 y WSM419C2$^+$ (C, D). Los asteriscos indican las bandas correspondientes a la acumulación de la proteína CelC2. pág.134

- **Figura** 39. Cuantificación de la actividad celulásica en extractos celulares por el método BCA. Los resultados se muestran en unidades enzimáticas (U), que se definen como la cantidad de enzima que libera un nmol del azúcar reductor equivalente (en este caso, glucosa) por minuto a 40ºC y pH5. Los resultados corresponden a la media de 3 determinaciones independientes. Las barras de error muestran la desviación estándar. pág.135

- **Figura** 40. Western blot de los extractos obtenidos de las cepas de *E. meliloti* 1021 y 1021C2$^+$. Se incluye un control de celulasa CelC2 purificada. pág.136

- **Figura** 41. Secuencia nucleotídica del fragmento clonado en el vector pBBR1-MCS-2, que contiene el gen *Smed_5210* (celulasa) de *E. medicae* WSM419. En negrita se resalta la secuencia correspondiente al gen; en verde y en azul se resaltan los primers *forward* y *reverse* utilizados para esta amplificación y que contienen sitios de corte EcoRI y XbaI, respectivamente. pág.137

- **Figura** 42. Esquema del plásmido pEMC$^+$, que contiene la celulasa de *Ensifer medicae* WSM419 clonada entre los sitios de restricción EcoRI y XbaI.

- **Figura** 43. Detección de actividad carboximetilcelulásica en placa de doble capa de los extractos proteicos obtenidos por sonicación de las cepas WSM419 (3) y WSM419EMC$^+$ (4). Como control positivo de actividad se utilizaron los extractos de las cepas ANU843 (1) y ANU843C2$^+$ (2). pág.138

- **Figura** 44. Separación y detección de isoenzimas mediante SDS-PAGE (A) y zimograma (B), respectivamente, realizados con los extractos celulares de las cepas a estudio, WSM419 y WSM419EMC$^+$, incluyendo un carril con el extracto de la cepa ANU843C2$^+$ como control. La flecha indica la banda correspondiente a la acumulación de la proteína CelC2 de *Rhizobium* y el asterisco indica la banda correspondiente a la acumulación de CelC de *Ensifer*. pág.140

- **Figura** 45. Cuantificación de la actividad celulásica en extractos celulares por el método BCA. Los resultados se muestran en unidades enzimáticas (U), que se definen como la cantidad de enzima que libera un nmol del azúcar reductor equivalente (en este caso, glucosa) por minuto a 40ºC y pH5. Los resultados corresponden a la media de 3 determinaciones independientes. Las barras de error muestran la desviación estándar. pág.141

- **Figura** 46. Colonias de distintos simbiontes de leguminosas en YMA suplementado con Rojo Congo. Escala compuesta de izquierda a derecha por *R. celullosilyticum* ALA10B2^T (+++), *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843 (++), *R. hainanense* I66^T (+) y *E. kostiense* LMG19227^T (-) (modificado de Robledo *et al*., 2012). pág.146

- **Figura** 47. Producción de celulosa de las distintas especies del género *Ensifer*. 1. *E. fredii* LMG6217^T, 2. *E. saheli* LMG7837^T, 3. *E. numidicus* LMG2490^T, 4. *E. americanum* CFNEI156^T, 5. *E. kostiense* LMG19227^T, 6. *E. meliloti* ATCC9930^T, 7. *E. medicae* USDA 1037^T, 8. *E. adherens* LMG20216^T, 9. *E. garamanticus* LMG24692^T, 10. *E. kummerowiae* CCBAV71714^T, 11. *E. chiapanecum* ITTG570^T, 12. *E. terangae* LMG7834^T, 13. *E. mexicanum* ITTGR7^T, 14. *E. morelense* LCO4^T, 15. *E. arboris* LMG 14919^T, 16. *E. meliloti* 1021, 17. *E. medicae* WSM419, 18. *E. sojae* LMG25493^T. pág.147

- **Figura** 48. Ensayo de formación de biofilms en placas de polivinilcloruro de las distintas especies que conforman el género *Ensifer*. Este ensayo se realiza a distintos tiempos de crecimiento estático en medio rico. La capacidad de formación de biofilms de las especies de estudio se midió a una DO 570nm, después de una tinción con Cristal Violeta al 0,3%, resuspendiendo las películas bacterianas que se formaron en el fondo en una solución etanol:acetona 4:1. Cada columna representa el valor medio de al menos 12 pocillos. Las barras de error representan el error estándar. pág.149

- **Figura** 49. Colonias cultivadas en medio YMA suplementado con 25 mg/l de Rojo Congo de las cepas *E. medicae* WSM419, *E.meliloti* 1021 y sus cepas superproductoras de celulasa CelC2. pág.151

- **Figura** 50. Ensayo de formación de biofilms en placas de polivinilcloruro de las distintas cepas de estudio y sus derivados superproductores de celulasa CelC2. El ensayo se realizó a distintos tiempos de crecimiento estático en medio rico suplementado con antibiótico cuando fué necesario. La capacidad de formación de biofilms de las especies de estudio se midió a 570 nm, después de una tinción con Cristal Violeta al 0,3%, resuspendiendo las películas bacterianas que se formaron en el fondo en una solución etanol:acetona 4:1. Antes de la medida del revelado se realizó una lectura a 595 nm para valorar el crecimiento y que no hubiese diferencias significativas entre ellas. Cada columna representa el valor medio de al menos 12 pocillos. Las barras de error representan el error estándar. pág.152

- **Figura** 51. Micrografías de fluorescencia que muestran la colonización de superficies radiculares llevada a cabo por las distintas cepas de estudio en distintas plantas. Se observa como *E. meliloti* 1021 coloniza normalmente la superficie de la raíz tanto de *M. sativa* (A) como *T. repens* (B). Este comportamiento es similar al de la cepa 1021C2$^+$ en M. sativa (D) y *T. repens* (E). En cuanto a la colonización de la superficie radicular de *M. truncatula* (C, F) de las cepas *E. medicae* WSM419 (C) y WSM419C2$^+$(F), el comportamiento es similar entre ellas y al de las cepas 1021 y 1021C2$^+$. El panel B está tomado de Robledo TD 2010. pág.153

- **Figura** 52. Micrografías de fluorescencia que muestran la colonización de pelos radiculares de *M. sativa* llevada a cabo por *E. meliloti* 1021 (A) y *E. meliloti* 1021C2$^+$ (B y C). *E. meliloti* 1021C2$^+$ no forma los típicos *caps* que forma *E. meliloti* 1021, si no que las bacterias se disponen alrededor del pelo radicular (B) o en la base (C). pág.154

- **Figura** 53. Distribución de la celulosa no cristalina en las raíces de *Trifolium repens* y eventos relacionados con la infección primaria. A) Estructura de celulosa cristalina de la raíz y nódulos de trébol blanco, B) de los pelos radicales, observándose como el ápice y el final del canal de infección (C, D) no presentan refringencia, es decir, no están formados de celulosa cristalina. En el ápice del pelo radicular se pueden observar los eventos en infección primaria, como el fenotipo HoT (E), curlings (F) y la formación de canales de infección (G). Los paneles A, B y D fueron tomados mediante microscopía de luz polarizada, los paneles C y F mediante microscopía óptica, el panel E mediante microscopía electrónica y finalmente el panel G se obtuvo mediante microscopía de fluorescencia (imagen modificada de Robledo *et al*., 2011). pág.159

- **Figura** 54. Microscopía óptica de pelos radiculares de alfalfa inoculados con *E. meliloti* 1021 (B, C), *E. meliloti* 1021C2$^+$ (D), ANU843 (E) y ANU843C2$^+$ (F), además de su control sin inocular (A). Las imágenes D (*Em* 1021C2$^+$) y F (*Rlt* ANU843C2$^+$) muestran la formación de redirecciones en los pelos radiculares (RaT) de *M. sativa* producidas por la sobreexpresión de la celulasa CelC2. pág.162

- **Figura** 55. Morfología (A, B) y cortes histológicos (C, D, E) de nódulos espontáneos encontrados en raíces de *M. sativa* inoculadas con ANU843C2$^+$. El interior de estos nódulos no se encuentra ocupado por los típicos simbiosomas (C, D), sino que existen cuerpos refringentes que podrían ser gránulos de almidón y algunas zonas presentan infección intercelular (E). pág.164

- **Figura** 56. Microscopía óptica (A-F) y confocal (G,H) de pelos radiculares de trébol inoculados con *E. meliloti* 1021 (B), *E. meliloti* 1021C2$^+$ (C, D), ANU843 (E) y ANU843C2$^+$ (F), además de su control sin inocular (A). Las imágenes G y H muestran el comportamiento como endófito que tiene la cepa 1021 en raíces de trébol, colocándose en los espacios intercelulares de las raíces. Las flechas señalan los eventos característicos de cada interacción. pág.165

- **Figura** 57. Micrografías de pelos radicales en raíces de *Medicago truncatula* inoculadas con *E. meliloti* 1021 (B, C) y *E. meliloti* 1021C2$^+$ (D-G), ambas marcadas con *lacZ*. En el control sin inocular (A) los pelos suelen estar intactos. *E. meliloti* 1021 coloniza la superficie de la raíz y produce las típicas estructuras, como "caps" (C), "curlings" y canales de infección (B). *E. meliloti* 1021C2$^+$ muestra un aumento en el número de pelos radicales con redirecciones (D), como también infecta, formando un tipo de curling aberrante o desorganizado (E). Además no forma caps, si no que se distribuye alrededor del pelo (F) o en su base (G). pág.169

- **Figura** 58. Micrografías de pelos radicales en raíces de *Medicago truncatula nfp1* 6 días post-inoculación. *E. meliloti* 1021 no es capaz de formar curlings ni penetrar en el pelo (B, C) y *E. meliloti* 1021C2$^+$ se comporta de igual manera (D) aunque existe un aumento en el número de pelos radicales con redirecciones (E). Control sin inocular (A). Las cepas están marcadas con *lacZ*. pág.170

- **Figura** 59. Micrografías de pelos radiculares de *M. truncatula* inoculados con *E. meliloti* 1021 (A, B) y *E. meliloti* 1021C2$^+$ (C, D, E) tratados con NBT. pág.172

- **Figura** 60. Análisis por PCR semicuantitativa (RT-PCR) de la expresión de los genes *vpy, chr7* y *rip1* en pelos radicales excindidos de plantas sin inocular (A), inoculadas con *E. meliloti* 1021 (B) y *E. meliloti* 1021C2$^+$ (C). pág.173

- **Figura** 61. Resultados normalizados de la PCR cuantitativa para el gen *chr7* (A), *vpy* (B) y *rip1* (C). Las barras coronadas por distintas letras corresponden a valores estadísticamente significativos (Test de Fisher p≤0,01). pág.174

- **Figura** 62. Número total de nódulos (A) y cinética de nodulación (B) de plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con las cepas *E. meliloti* 1021 y 1021C2$^+$ en ausencia de Nitrógeno durante los siguientes 30 días post-inoculación. pág.180

- **Figura** 63. Morfología de nódulos de *M. sativa* inoculadas con *E. meliloti* 1021 (A, E) y *E. meliloti* 1021C2$^+$ (B, F), *M. truncatula* inoculadas con *E. meliloti* 1021 (C, G) y *E. meliloti* 1021C2$^+$(D, H). En los nódulos de ambas plantas inoculadas con la cepa silvestre se observa una coloración rosácea y su forma piriforme (A, E, C, G), característica de nódulos indeterminados, mientras que en los nódulos de ambas plantas inoculadas con la cepa superproductora (B, D, F, H) se observan coloraciones blanquecinas y/o marronáceas y formas redondeadas (B, D, H) y/o aberrantes (F). La barra representa la escala 1 mm. pág.181

- **Figura** 64. Cortes histológicos realizados en nódulos de *M. sativa* inoculadas con *E. meliloti* 1021 (A, E, I) y *E. meliloti* 1021C2$^+$ (B, F, J), *M. truncatula* inoculadas con *E. meliloti* 1021 (C, G, K) y *E. meliloti* 1021C2$^+$(D, H, L). En los nódulos de ambas plantas inoculadas con la cepa superproductora (B, F, J, D, H, L) se muestran zonas desorganizadas correspondientes a la zona de infección del nódulo, con respecto de lo mostrado por los nódulos de la cepa salvaje (A, E, I, C, G, K). El mutante superproductor produce una extensiva degradación del final del canal de infección y no aparecen los típicos simbiosomas (J, L), que sí aparecen perfectamente definidos en las células de los nódulos de las plantas inoculadas con la cepa salvaje (I, K). Los nódulos de *M. truncatula* inoculadas con la cepa salvaje muestran un menor número de células invadidas (G) respecto a los nódulos de *M. sativa* inoculados con dicha cepa salvaje (E), donde se puede apreciar un mayor número de células infectadas (E, I). Las flechas señalan los eventos referidos en el texto y los recuadros delimitan la zona de infección o zona II, en la cual se observa el efecto de la sobreexpresión de la celulasa CelC2. pág.182

- **Figura** 65. Morfología de nódulos de *M. truncatula* inoculadas con *E. meliloti* 1021 (A) y *E. meliloti* 1021C2$^+$(B). En los nódulos de ambas plantas inoculadas con la cepa silvestre se observa una coloración blanquecina y una forma redondeada, signo de que no son funcionales. La barra representa la escala 1 mm. pág.184

- **Figura** 66. Cortes histológicos realizados en nódulos de *M. truncatula* inoculadas con *E. meliloti* 1021 (A, B, C) y *E. meliloti* 1021C2$^+$ (D, E, F). Los nódulos de ambas inoculaciones no poseen simbiosomas formados (A, D) aunque se observa infección intercelular en ambos casos (B, E). Las bacterias entran por espacios intercelulares en ambos casos (C, F), aunque existe cierta

degradación de paredes celulares en los nódulos de la cepa 1021C2$^+$ (F). Las flechas señalan los eventos referidos en el texto. pág.185

- **Figura** 67. Número total de nódulos (A) y cinética de nodulación (B) de plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con las cepas *E. medicae* WSM419 y WSM419C2$^+$ en ausencia de Nitrógeno durante los siguientes 30 días post-inoculación. pág.186

- **Figura** 68. Morfología de nódulos de plantas de *M. truncatula* inoculadas con *E. medicae* WSM419 (A, C) y *E. medicae* WSM419C2$^+$ (B, D). La morfología de los nódulos de las plantas inoculadas con la cepa superproductora (B, D) es irregular y muestran un color blanquecino con respecto a los nódulos de plantas inoculadas con la cepa salvaje (A, C) que son morfológicamente normales y fijadores. pág.187

- **Figura** 69. Cortes histológicos realizados en nódulos de *M. truncatula* inoculadas con *E. medicae* WSM419 (A, C, E) y *E. medicae* WSM419C2$^+$ (B, D, F). En los cortes histológicos de las plantas inoculadas con la cepa superproductora (B, D, F) se observan zonas desorganizadas correspondientes a la zona de infección del nódulo (B), con respecto de lo mostrado por los nódulos de la cepa salvaje (A, C, E), que contienen sus zonas intactas (A). Se observa una degradación de paredes celulares y la liberación de bacterias no diferenciadas al interior celular (F) en el caso de los nódulos de la cepa WSM419C2$^+$, respecto de las células ocupadas por bacterias diferenciadas de los nódulos de la cepa salvaje (E). Las flechas señalan los eventos referidos en el texto. Los recuadros muestran la zona de infección o zona II. pág.188

- **Figura** 70. Número total de nódulos (A) y cinética de nodulación (B) de plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con las cepas *E. medicae* WSM419 y WSM419EMC$^+$ en ausencia de Nitrógeno durante los siguientes 30 días post-inoculación. pág.190

- **Figura** 71. Morfología de los distintos tipos de nódulos que aparecen en las raíces de las plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con la cepa superproductora del ortólogo de la CelC2 en *Ensifer medicae* WSM419 (WSM419EMC$^+$). De entre estas diversas morfologías se pueden observar nódulos piriformes fijadores (A), nódulos con zonas estrechas (B), nódulos redondos no fijadores (C), nódulos dobles con zonas blancas (D) y nódulos marrones con apariencia gomosa y redondeada (E). pág.191

- **Figura** 72. Cortes histológicos de los distintos tipos de nódulos que aparecen en las raíces de las plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con la cepa superproductora del ortólogo de la CelC2 en *Ensifer medicae* WSM419 (WSM419EMC$^+$). Se observan nódulos fijadores (A, corte transversal) con estructuras internas similares a las observadas en la cepa salvaje (D), además de contener células en espacios intercelulares. Se observan nódulos

aberrantes con el interior en su mayoría vacío (B, C). Se aprecian bacterias ocupando espacios intercelulares, formando canales (E), y bacterias sueltas dentro de las células vegetales (F), algunas de ellas rompiendo la pared celular de las células vegetales (F, G). Las flechas señalan los eventos referidos en el texto. pág.192

- **Figura** 73. Fenotipo mostrado por las plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con el mutante sobreproductor *E. meliloti* 1021C2^{+} (A), inoculadas con *E. meliloti* 1021 (B) y plantas control sin inocular (C). Estas plantas se cultivaron durante 90 días en condiciones de invernadero en ausencia de fertilizantes nitrogenados. pág.198

- **Figura** 74. Longitud de la parte aérea (A) y peso seco de la parte aérea (B) de plantas de *Medicago truncatula* cultivadas bajo condiciones controladas de invernadero durante tres meses y abonadas con solución de Fâhraeus sin Nitrógeno. La gráfica se realizó con valores medios representativos de tres experimentos independientes de al menos 30 plantas cada uno. Las barras de error representan el error estándar. Los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos (Test de Fischer $p \geq 0,01$). pág.199

- **Figura** 75. Longitud de la parte radicular de plantas de *Medicago truncatula* cultivadas bajo condiciones controladas de invernadero durante tres meses y abonadas con solución de Fâhraeus sin Nitrógeno. La gráfica se realizó con valores medios representativos de tres experimentos independientes de al menos 30 plantas cada uno. Las barras de error representan el error estándar. Los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos (Test de Fischer $p \geq 0,01$). pág.199

- **Figura** 76. Contenido en Nitrógeno de plantas de *Medicago truncatula* cultivadas en invernadero durante tres meses y abonadas con solución de Fâhraeus sin Nitrógeno. La gráfica se realizó con valores medios representativos de tres experimentos independientes de al menos 30 plantas cada uno. Las barras de error representan el error estándar. Los valores seguidos de la misma letra no son significativos (Test de Fischer $p \geq 0,01$). pág.200

- **Figura** 77. Fenotipo mostrado por las plantas de *Medicago truncatula*, control sin inocular (A); inoculadas con *E. medicae* WSM419 (B); inoculadas con el mutante sobreproductor WSM419C2^{+} (C) y WSM419EMC^{+} (D) en ausencia de Nitrógeno. pág.202

- **Figura** 78. Longitud de la parte aérea (A), peso seco de la parte aérea (B), longitud de la parte radicular (C) y peso seco de la parte radicular (D) de plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con *E. medicae* WSM419 y sus derivados sobreproductores y cultivadas bajo condiciones controladas de invernadero durante tres meses y abonadas con solución de Fâhraeus sin

Nitrógeno. La gráfica se realizó con valores medios representativos de cuatro experimentos independientes de al menos 30 plantas cada uno. Las barras de error representan el error estándar. Los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos (Test de Fischer $p \geq 0,01$). pág.203

- **Figura** 79. Contenido en Nitrógeno de plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con *E. medicae* WSM419 y sus derivados sobreproductores y cultivadas en invernadero durante tres meses y abonadas con solución de Fâhraeus sin Nitrógeno. La gráfica se realizó con valores medios representativos de dos experimentos independientes de al menos 30 plantas cada uno. Las barras de error representan el error estándar. Los valores seguidos de la misma letra no son significativos (Test de Fischer $p \geq 0,01$). pág.204

- **Figura** 80. Fenotipo mostrado por las plantas de *Medicago truncatula*, control sin inocular (A), inoculadas con *E. meliloti* 1021 (B) e inoculadas con el mutante sobreproductor *E. meliloti* 1021C2^{+} (C) en presencia de Nitrógeno. pág.206

- **Figura** 81. Longitud de la parte aérea (A) y peso seco de la parte aérea (B) de plantas de *Medicago truncatula* cultivadas bajo condiciones controladas de invernadero durante tres meses y abonadas con solución de Fâhraeus suplementada con Nitrógeno. La gráfica se realizó con valores medios representativos de dos experimentos independientes de al menos 30 plantas cada uno. Las barras de error representan el error estándar. Los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos (Test de Fischer $p \geq 0,01$). pág.207

- **Figura** 82. Longitud de la parte radicular de plantas de *Medicago truncatula* cultivadas bajo condiciones controladas de invernadero durante tres meses y abonadas con solución de Fâhraeus suplementada con Nitrógeno. La gráfica se realizó con valores medios representativos de dos experimentos independientes de al menos 30 plantas cada uno. Las barras de error representan el error estándar. Los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos (Test de Fischer $p \geq 0,01$). pág.208

- **Figura** 83. Fenotipo mostrado por las plantas de *Medicago truncatula*, control sin inocular (A), inoculadas con *E. medicae* WSM419 (B) e inoculadas con el mutante sobreproductor WSM419C2^{+} (C) y WSM419EMC^{+} en presencia de Nitrógeno. pág.209

- **Figura** 84. Longitud de la parte aérea (A), peso seco de la parte aérea (B) y longitud de la parte radicular (C) de plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con *E. medicae* y sus derivados sobreproductores cultivadas bajo condiciones controladas de invernadero durante tres meses y abonadas con solución de Fâhraeus suplementada con Nitrógeno (NH_4NO_3). La gráfica se realizó con

valores medios representativos de dos experimentos independientes de al menos 30 plantas cada uno. Las barras de error representan el error estándar. Los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos (Test de Fischer $p \geq 0,01$). pág.210

- **Figura** 85. Representación esquemática de los dominios PF13641 y PF07238, correspondientes a la superfamilia Glicosil Transferasa putativa 2 (CelA, rojo) y a PilZ (dominio de unión a di-GMP cíclico), respectivamente, que existen en la celulasa CelC2 de *Rhizobium*. BLASTP. pág.220

- **Figura** 86. Representación esquemática del dominio Pfam01270, correspondiente a la superfamilia 8 de las Glicosil Hidrolasas (rojo), que existe en la celulasa CelC2 de *Rhizobium*. Se muestra el péptido señal (azul cielo). BLASTP. pág.221

- **Figura** 87. Alineamiento de las secuencias proteicas pertenecientes a las celulasas CelC2 de *Rhizobium* y *Ensifer* y sus homólogos en el alga verde unicelular *Coccomyxa subellipsoidea*. Geneious 4. 8. 4 (MUSCLE alingment). Se observan aminoácidos conservados en verde oscuro (Secuencia Logo única y de mayor tamaño). pág.223

- **Figura** 88. Fenotipo mostrado por las plantas de *Medicago truncatula* transformadas, de izquierda a derecha, transformadas con el vector pKEV sin inocular (A), transformadas con el vector pKEV e inoculadas con *E. meliloti* 1021 (B), transformadas con el vector pKcelC sin inocular (C) y transformadas con el vector pKcelC inoculadas con *E. meliloti* 1021 (D). pág.226

- **Figura** 89. Longitud de la parte aérea de plantas de *Medicago truncatula* con raíces transformadas y cultivadas en ausencia de Nitrógeno. La gráfica representa los valores medios representativos de 3 ensayos independientes de al menos 12 plantas cada uno por cada tratamiento. Las barras de error representan el error estándar. Las barras coronadas con un asterisco representan valores significativos (Fisher's PLSD $p \leq 0,05$). pág.227

- **Figura** 90. Peso seco de la parte aérea de plantas de *Medicago truncatula* con raíces transformadas y cultivadas en ausencia de Nitrógeno. La gráfica representa los valores medios representativos de 3 ensayos independientes de al menos 12 plantas cada uno por cada tratamiento. Las barras de error representan el error estándar. Las barras coronadas con un asterisco representan valores significativos (Fisher's PLSD $p \leq 0,05$). pág.228

- **Figura** 91. Longitud de la parte radicular de plantas de *Medicago truncatula* con raíces transformadas y cultivadas en ausencia de Nitrógeno. La gráfica representa los valores medios representativos de 3 ensayos independientes de al menos 12 plantas cada uno por cada tratamiento. Las barras de error

representan el error estándar. Las barras coronadas con un asterisco representan valores significativos (Fisher's PLSD p ≤0,05). pág.228

- **Figura** 92. Cantidad de Nitrógeno (mg de Nitrógeno por planta) en plantas de *Medicago truncatula* con raíces transformadas y cultivadas en ausencia de Nitrógeno. La gráfica representa los valores medios representativos de dos ensayos independientes de al menos 12 plantas cada uno por cada tratamiento. Las barras de error representan el error estándar. Las barras coronadas con un asterisco representan valores significativos (Fisher's PLSD p ≤0,05). pág.229

- **Figura** 93 Ejemplos de los fenotipos encontrados en pelos radiculares de plantas transformadas con el vector pKcelC e inoculadas con la cepa *E. meliloti* 1021. A) Inicio de adhesión del rizobio al pelo radicular. B) "Cap". C) Inicio de curling. D) Canal de infección. E) Redirecciones polares. La barra de escala representa 25 µm. pág.330

- **Figura** 94. Número total de nódulos en plantas transformadas (A) y número de nódulos fijadores (B). Las gráficas se realizaron con valores medios de los contajes de nódulos de tres experimentos independientes de al menos 12 plantas cada uno. Las barras de error representan la desviación estándar. Los valores seguidos por un asterisco son estadísticamente significativos (Test de Fischer p ≤ 0,01). pág.331

- **Figura** 95. Morfología nodular y cortes histológicos de nódulos de plantas transformadas de *Medicago truncatula* e inoculadas con *E. meliloti* 1021. En nódulos de plantas transformadas con el vector vacío o pKEV, se observa la típica morfología de un nódulo en condiciones normales (A, B) y las células ocupadas por los típicos simbiosomas (C). Los nódulos de plantas transformadas con el plásmido pKcelC tienen similar morfología a los nódulos de plantas sin transformar inoculadas con la cepa 1021C2+ (D, E), interior desorganizado y la no formación de simbiosomas típicos (F). Las barras de escala indican 100 µm (A, D), 50 µm (B, E) y 16 µm (C, F). pág.332

- **Figura** 96. Inmunolocalización de la Celulasa CelC2 en raíces de plantas de *M. truncatula* transformadas con el gen *celC* de *Rhizobium* (A). La raíz transformada, que expresa una GFP (D), mantiene intacta su estructura excepto en el interior del nódulo. La tinción DAPI (C) pone de manifiesto una desorganización de la zona interior del nódulo, debido a la ausencia de núcleos. La celulasa CelC2, que está marcada con Cy3 (B) se localiza en todas las células de la raíz transformada incluido el nódulo. Las barras de escala indican 100 µm. pág.334

- **Figura** 97. Inmunolocalización de la Celulasa CelC2 en cortes de nódulos de raíz transformada de *Medicago truncatula* e inoculada con *E. meliloti* 1021. Se aprecia que la estructura de la raíz de la planta transformada se mantiene

intacta (A) limitando la acción de la celulasa CelC2 a la zona de infección en el interior del nódulo (B). La celulasa se localiza mediante fluorescencia (fluorocromo Cy3) en la pared celular y/o membrana de las células del nódulo (C). Las barras de escala indican 100 µm (A), 25 µm (B) y 16 µm (C). pág.235

- **Figura** 98. Micrografía de la inmunolocalización de la celulasa CelC2 en un nódulo de *M. truncatula* inoculado con *E. meliloti* 1021C2+ tomada mediante microscopía confocal. Las flechas señalan las bacterias que expresan la celulasa CelC2 en espacios intercelulares, además de la observación de canales de infección y la liberación de las bacterias sin diferenciar al interior celular. pág.236

- **Figura** 99. Secciones de nódulos de *Medicago truncatula* A17 (A) y *nip1* (B, C, D) observados mediante microscopía de fluorescencia. Las paredes celulares vegetales se muestran en azul y los lugares donde hay bacterias en verde (fluoróforo SYTO-13). No existe liberación de las bacterias al final del canal de infección en el mutante *nip1* (C). Además, se muestran engrosamientos en el canal de infección (D) (modificada de Veereshlingam *et al*., 2004). Las barras de escala indican 100 µm (A, B) y 20 µm (C, D). pág.237

- **Figura** 100. Micrografía de un nódulo de *M. truncatula nip3* inoculado con *E. meliloti* 1021C2+ tomada mediante microscopía confocal. Las flechas señalan los canales de infección característicos de este mutante en el interior celular. Las barras de escala representan 150 µm. pág.238

- **Figura** 101. Micrografías de nódulos de plantas de *M. truncatula nip3* transformadas con el vector pKcelC e inoculadas con *E. meliloti* 1021 RFP. No se observa fenotipo Bar al final de los canales de infección (A, C) los cuales son visiblemente más gruesos de lo normal (B). Las barras de escala representan 50 µm (A), 25 µm (B) y 16 µm (C). pág.239

- **Figura** 102. Fenotipo mostrado por las plantas de *Medicago truncatula* transformadas: A) transformadas con el vector vacío pKEV sin inocular, B) transformadas con el vector pKcelC sin inocular. Estas plantas se cultivaron en presencia de Nitrógeno (NH_4NO_3 5mM) durante 90 días, en condiciones controladas de invernadero. Las raíces transformadas se comprobaron mediante microscopía de fluorescencia, ya que expresan una GFP (C). pág.241

- **Figura** 103. Longitud de la parte aérea (A), peso seco de la parte aérea (B), longitud de la parte radicular (C) y contenido en Nitrógeno por planta (D) de plantas de *Medicago truncatula* con raíces transformadas y cultivadas en presencia de Nitrógeno. La gráfica representa los valores medios representativos de un ensayo de al menos 12 plantas por tratamiento. Las barras de error representan el error estándar. Las barras coronadas con letras

diferentes representan valores estadísticamente significativos (Fisher's PLSD $p \leq 0,05$). pág.242

THESIS SUMMARY

-Figure 1. *In vitro* biofilm-forming capacity in PVC plates (A) and cellulose prodution qualitative assay in YMA media supplemented with Congo Red (B), which binds especifically to cellulose, of *E. medicae* WSM419, *E.meliloti* 1021 and its CelC2 derivatives. CelC2-overproducer mutants show no significative differences in those assays regarding to wild-type strains. pág.305

-Figure 2. *celC* gene expression zones in root hairs (A) and nodule (B) in *Trifolium repens*. Rhizobial cells expressing *gfp* from the *celC* promoter are located in the infection pockets, infection threads (A) and in the infection zone of the mature nodule (B), not expression is showed in fixation and senescence zone (B). pág.306

-Figure 3. Nodule sections of *Medicago truncatula* plants inoculated with *E. meliloti* 1021 (A, E, I), *E. meliloti* 1021C2$^+$ (B, F, J), *E. medicae* WSM419 (C, G, K) and *E. medicae* WSM419C2$^+$ (D, H, L). Wild-type nodules of each strain exhibit typical invaded cells (A, E, C, G) but 1021 nodules (E) show less occupancy than WSM419 nodules (G). CelC2 derivative nodules in both strains exhibit inner desorganization at the infection zone level (B, F, D, H), showing alterated Bar phenotype and ineficciency in symbiosome formation (F, H). Naked bacteria degrade cell wall, producing the effect of desorganization (J, L). Arrows point the main events described in text and squares enclose nodule infection zones. Bars indicate scales 200 µm (A, B, C, D), 50µm (E, F, G, H) and 16 µm (I, J, K, L). pág.309

-Figure 4. Nodule sections of *Medicago truncatula* plants inoculated with *E. medicae* WSM419EMC$^+$. Invaded nodules were observed (A), showing similar structures than wild type and bacterial cell as enclosed in intercellular spaces (D). Most of the nodules were empty (B, C), showing bacterial cells enclosed in intercellular spaces and infection threads (E). Naked bacteria are inside nodule cells (F) producing cell wall degradation (G). This phenotype is less severe than the phenotype observed with CelC2 derivatives. Arrows point the main events described in text. Bars indicate scales 200 µm (A), 100 µm (B, C), 50µm (D), 16 µm (E) and 8 µm (G). pág.310

-Figure 5. Root-transformed *Medicago* plants development. A, Whole plant phenotype root-transformed with pKEV versus pKcelC, cultivated in Nitrogen presence as fertilizer under greenhouse conditions during 3 months. B, shoot length; C, shoot dry weight; D, root length and E, Nitrogen content per plant. Graph columns represent the mean of at least 12 replica plants per treatment. Error bars indicate standard error. Values followed by the same letter are not signifficant from each other ($p \leq 0,05$). pág.311

-**Tabla** 1. Taxonomía rhizobiana, parte 1. Modificado de Weir, B.S. (2012) The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. Fecha actualización: Mayo 2014. pág.14

-**Tabla** 2. Taxonomía rhizobiana, parte 2. Modificado de Weir, B.S. (2012) The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. Fecha actualización: Mayo 2014. pág.15

-**Tabla** 3. Taxonomía rhizobiana, parte 3. Modificado de Weir, B.S. (2012) The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. Fecha actualización: Mayo 2014. pág.16

-**Tabla** 4. Cepas de *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *meliloti* 1021 utilizadas en este trabajo. pág.55

-**Tabla** 5. Cepas de *Ensifer (Sinorhizobium) medicae* WSM419 utilizadas en este trabajo. pág.56

-**Tabla** 6. Bacterias del genero *Rhizobium*, *R. leguminosarum* bv. trifolii (6 primeras filas) y *Rhizobium* (*Agrobacterium*) *rhizogenes* (2 últimas filas) que han sido utilizadas para este trabajo. pág.56

-**Tabla** 7. Concentración de antibióticos (µg/mL) utilizados para suplementar los medios de cultivo de las cepas que lo requieran. pág.60

-**Tabla** 8. Composición de soluciones para extracción de DNAp. pág.86

-**Tabla** 9. Reacción de digestión de DNA genómico residual. pág.90

-**Tabla** 10. Mezcla RNA molde/primer. pág.90

-**Tabla** 11. Mezcla de reacción para síntesis de cDNA. pág.91

-**Tabla** 12. Primers utilizados en este trabajo. pág.92

-**Tabla** 13. Mix de reacción REDExtract Ready Master Mix. pág.93

-**Tabla** 14. Programa de PCR pág.93

-**Tabla** 15. Mix de reacción DreamTaq Green Master Mix pág.94

-**Tabla** 16. Programa de PCR pág.94

-**Tabla** 17. Mezcla de reacción qPCR pág.95

-**Tabla** 18. Programa de qPCR. pág.95

-**Tabla** 19. Plásmidos utilizados en este trabajo. pág.101

-**Tabla** 20. Mezcla de reacción de enzimas de restricción pág.102

-**Tabla** 21. Mezcla de reacción TSAP pág.102

-**Tabla** 22. Reacción de ligación T4 DNA ligasa ("*sticky end ligation*") pág.103

-**Tabla** 23. Composición tampón Z. pág.107

-**Tabla** 24. Composición de la solución de X-Gal. pág.107

-**Tabla** 25. Porcentaje de similitud y funciones anotadas de proteínas obtenidos enfrentando la secuencia aminoacídica de la celulosa sintasa CelA descrita en *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843 con la base de datos del NCBI, utilizando la herramienta BLASTp. pág.120

-**Tabla** 26. Porcentaje de similitud y funciones anotadas de proteínas obtenidos enfrentando la secuencia aminoacídica de la subunidad B de celulosa sintasa CelB descrita en *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843 con la base de datos del NCBI, utilizando la herramienta BLASTp. pág.121

-**Tabla** 27. Porcentaje de similitud y funciones anotadas de proteínas obtenidos enfrentando la secuencia aminoacídica de la celulasa CelC descrita en *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843 con la base de datos del NCBI, utilizando la herramienta BLASTp. pág.122

-**Tabla** 28. Especies dentro del género *Ensifer* con secuencias similares al operón *celABC*. pág.130

-**Tabla** 29. Producción de celulosa en especies del género *Ensifer*. Escala cualitativa de color de acuerdo con la escala de la "Royal Horticultural Society Color Chart" de la Royal Horticultural Society (1966). pág.148

-**Tabla** 30. Fenotipos simbióticos observados en raíces de *M. sativa* a los 20 días post-inoculación con las cepas 1021, ANU843 y sus derivados CelC2^{+}, cuyas combinaciones se analizaron por separado. Los valores muestran la media y el error estándar de al menos 6 plantas por ensayo para cada uno de los fenotipos (Had/Hac (*Hair deformation and Hair curling*), HoT (*Hole on the Tip*) y RaT (*Redirections at the Tip*)). Los resultados se muestran como la media ± el error estándar. Valores seguidos de diferente letra son estadísticamente significativos (Test de Fisher p≤0,05). pág.162

-Tabla 31. Fenotipos simbióticos observados en raíces de *T. repens* a los 20 días post-inoculación con las cepas 1021 y 1021C2^{+}. Los valores muestran la media y el error estándar de al menos 6 plantas por ensayo para cada uno de los fenotipos (Had/Hac (*Hair deformation and Hair curling*), HoT (*Hole on the Tip*) y RaT (*Redirections at the Tip*)). Los valores se muestran como la media ± error estándar. Valores seguidos de diferente letra son estadísticamente significativos (Test de Fisher p≤0,05). pág.166

-Tabla 32. Fenotipo simbiótico RaT observado en raíces de *T. repens* a los 20 días post-inoculación con las cepas ANU843 y ANU843C2^{+}. Los valores muestran la media y el error estándar de al menos 6 plantas por ensayo. Los valores se muestran como la media ± error estándar. Valores seguidos de diferente letra son estadísticamente significativos (Test de Fisher p≤0,05). pág.167

-Tabla 33. Fenotipos en infección primaria en plantas de *Medicago truncatula*. Se muestran los valores medios representativos de tres ensayos independientes de al menos 5 plantas cada uno y 6 días post-inoculación. Los resultados se muestran como la media ± el error estándar. Valores seguidos de un asterisco son significativos (Test de Fisher p≤0,01). pág.170

-Tabla 34. Fenotipo simbiótico RaT observado en raíces de *M.truncatula nfp1* a los 6 días post-inoculación con las cepas 1021 y 1021C2^{+}. Los valores muestran la media y el error estándar de al menos 6 plantas por ensayo. Los valores se muestran como la media ± error estándar. Valores seguidos de diferente letra son estadísticamente significativos (Test de Fisher p≤0,05). pág.171

-Tabla 35. Valores expresados en miligramos por gramos de planta analizado en los principales elementos esenciales analizados en la parte aérea de *M. truncatula* inoculadas con WSM419, WSM419C2^{+} y WSM419EMC^{+} en presencia y ausencia de Nitrógeno. Los valores representan la media ± el error estándar. Valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente significativos según el test LSD protegido de Fisher (p≥0,05). pág.212

-Tabla 36. Resumen de los fenotipos observados en las diferentes combinaciones planta rizobio utilizadas durante el desarrollo de esta tesis doctoral. pág.252

THESIS SUMMARY

-Table 1. Species among the genus *Ensifer* with rhizobial *celABC* operon similarities at nucleotide sequence level. pág.304

-Table 2. Summary of symbiotic phenotypes observed in the different combinations rhizobia-plant used in our studies. pág.307



INTRODUCCIÓN

1. La necesidad mundial de una agricultura sostenible y eficiente.

Actualmente, en un escenario global en el que hay deficiencia en la producción de alimentos, la población mundial está en continuo crecimiento. Tanto es así que, en el año 2013 y según datos de la Organización de Naciones Unidas (ONU), el planeta está habitado por 7046 millones de personas. En el año 2050, se estima que la población mundial aumentará hasta alcanzar los 9600 millones de habitantes (Banco Mundial, 2013. www.worldbank.org).

El crecimiento de la población mundial, sobre todo debido al crecimiento demográfico en los países no desarrollados, es un motivo de preocupación global. Estos países, que sufren continuas hambrunas, son los más susceptibles a los problemas en el aumento y optimización de la produción agrícola mundial. De acuerdo con datos recientes de la ONU, más de 870 millones de personas están malnutridas en el mundo, siendo los niños los más afectados (figura 1). Cerca de 2,6 millones de niños mueren cada año debido a la malnutrición y uno de cada seis está por debajo de su peso ideal.

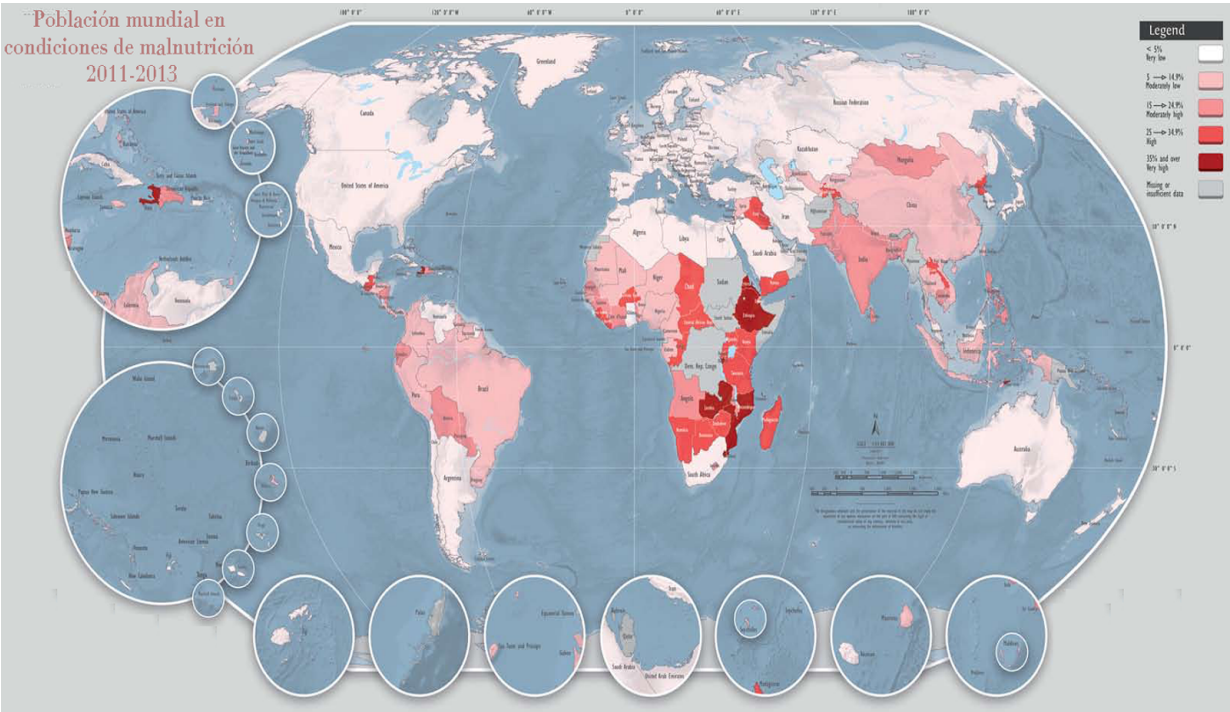


Figura 1. Mapa mundial que representa el porcentaje de población malnutrida. Más del 90% de habitantes en estado de malnutrición están en los países subdesarrollados. Según leyenda, los estados coloreados en rojo oscuro son los que sufren mayor porcentaje de desnutrición (Datos FAO, 2013 www.fao.org/hunger/en).

El incremento de la población comenzó a ser notable a mediados del siglo XX, período en el que se produjeron una serie de cambios en la tecnología que se venía utilizando en agricultura, mejorando dicha tecnología e implementando técnicas para la síntesis de fertilizantes químicos, por ejemplo la síntesis industrial de amonio a partir de Nitrógeno molecular o ciclo de Haber-Bosch. Este cambio se denominó Revolución Verde, la cual trajo consigo un espectacular aumento en la productividad de los cultivos y dicho incremento de la población (Galloway, 2005). Este hecho, provocó el agotamiento y la degradación progresiva de la tierra y del agua, afectando gravemente la capacidad de cultivar alimentos y otros productos necesarios para sustentar los medios de vida, sobre todo en países no desarrollados y satisfacer las necesidades de la población urbana (Datos FAO 2013).

Si bien, la superficie de tierra agrícola (cerca de 50 millones de kilómetros cuadrados) se ha mantenido estable desde los años 90 hasta la actualidad, la superficie de tierra cultivable ha disminuido casi a la mitad (Datos FAO 2013). En estos momentos, la producción agrícola mundial es deficiente y, en un marco de crecimiento demográfico en auge, es necesario buscar alternativas que contribuyan a construir una agricultura sostenible y eficiente.

2. Problemática del uso de fertilizantes químicos.

El Nitrógeno molecular es el principal constituyente de la atmósfera (78% por volumen de aire seco). El Nitrógeno puede ser encontrado en forma de nitratos y nitritos en agua y suelos. Todos ellos son parte del ciclo del Nitrógeno, existiendo una conexión entre todos. Además, el Nitrógeno es un elemento esencial para la vida ya que forma parte de los ácidos nucleicos y las proteínas, con lo cual participa en el metabolismo de cualquier célula. A pesar de su abundancia, es uno de los principales limitantes en producción agrícola, debido a que las plantas sólo pueden asimilarlo en estado combinado con O_2 o H_2, en forma de amonio o nitratos (figura 2).

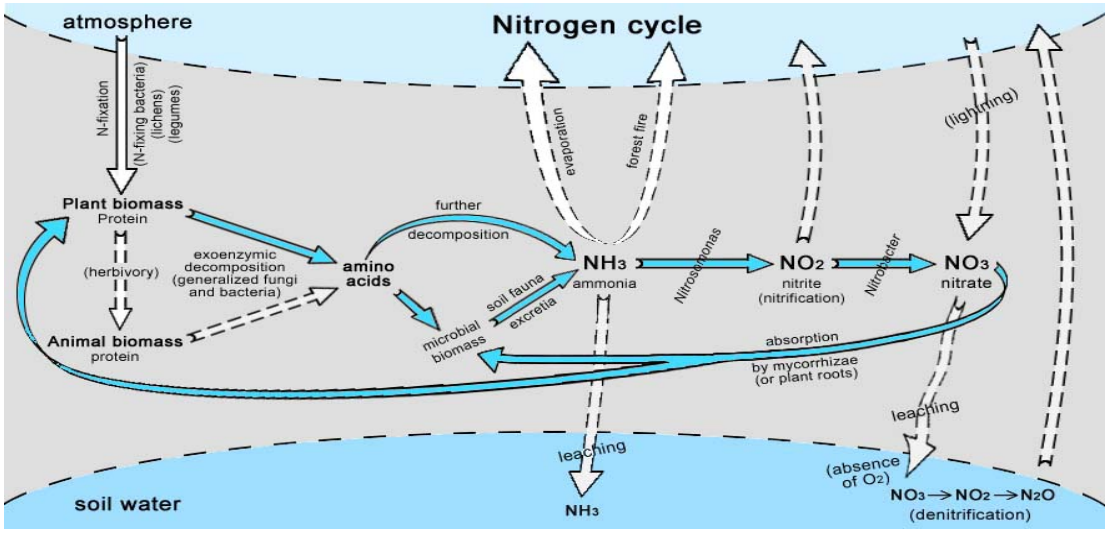
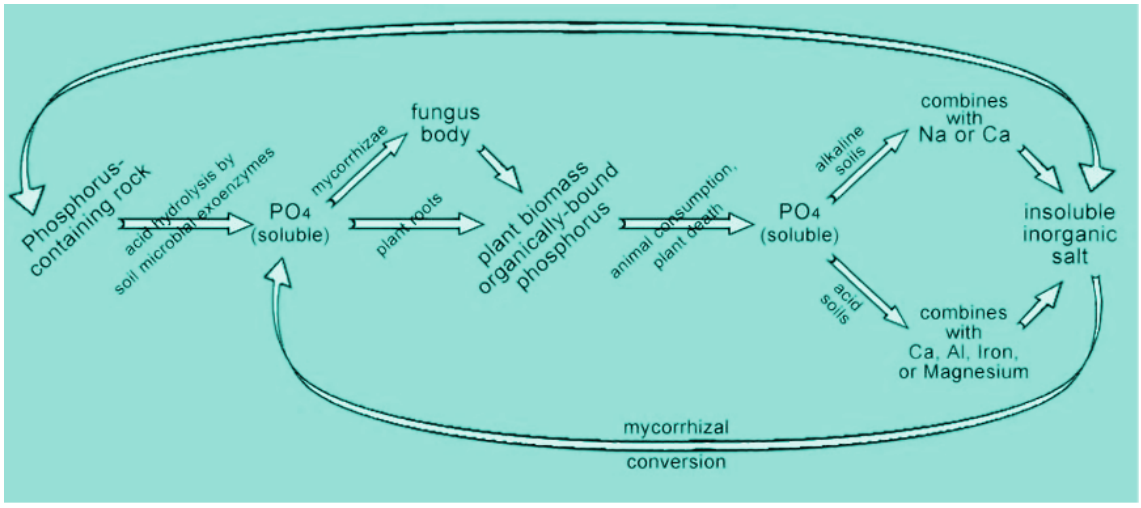


Figura 2. El ciclo biogeoquímico del Nitrógeno (Ecoplexity, Portland State University, 2010; http://ecoplexity.org/).

Tanto o más que el Nitrógeno, el Fósforo es un elemento fundamental en la nutrición vegetal. Es absorbido por las plantas en forma de fosfatos mono y dibásicos (figura 3). A diferencia del Nitrógeno, el Fósforo es un elemento poco móvil. Por su tendencia a reaccionar dando formas fosforadas no disponibles para las plantas, debe ser considerado uno de los elementos críticos en agricultura.



$PO_4^{\equiv}$ ion is soluble in water
$PO_4^{\equiv}$ is the only form that plants take in the roots
$PO_4^{\equiv}$ forms insoluble salts VERY rapidly, therefore PO_4 (the only useful form of Phosphorous) is usually limiting for plant growth.
Mycorrhizae (many different types) are able to solubilize the complex inorganic phosphate salts of heavy metals.

Figura 3. El ciclo biogeoquímico del Fósforo (Ecoplexity, Portland State University, 2010; http://ecoplexity.org/).

El uso de los fertilizantes nitrogenados ha provocado cambios en el ciclo natural del Nitrógeno desencadenándose una serie de efectos adversos medioambientales, como el aumento en el efecto invernadero y la polución atmosférica, la acidificación de suelos, eutrofización de aguas y la pérdida de biodiversidad. También, provoca efectos negativos sobre la salud humana y animal (Cowling *et al.,* 2001), es decir, problemas ecológicos y sociales que acarrearán efectos negativos a nivel ambiental y humano (Erisman *et al.,* 2011). El abuso de los fertilizantes fosfatados también ha influido en su ciclo natural y ha provocado efectos adversos en el medioambiente, sobre todo, problemas de eutrofización de aguas.

En respuesta a estos efectos adversos, se puso mucha atención de manera global en la búsqueda de fuentes más sostenibles de estos nutrientes, con un mínimo impacto en el medio ambiente pero permitiendo un mayor desarrollo de los cultivos. Las nuevas directrices a nivel nacional y europeo están encaminadas a un mejor uso de recursos naturales, como por ejemplo el capítulo IV de la ley 43/2002 de Sanidad Vegetal del 20 de Noviembre de 2002, en el que se acepta el uso de microorganismos como agentes biológicos útiles en cultivos y por tanto, podrán ser utilizados como biofertilizantes por su capacidad de favorecer la nutrición de las plantas, actuar como defensa sistémica contra patógenos y favorecer la producción de fitohormonas por parte de la planta.

Dentro del Programa Marco Europeo "Horizonte 2020" y de sus programas predecesores, se promueve la investigación y desarrollo de nuevos fertilizantes que ayuden a mantener una agricultura sostenible y un aumento en la producción agrícola. En el año 2007, a nivel nacional y en concordancia con el VII Programa Marco Europeo, existente en ese momento, el Ministerio de Medio Ambiente emitió el informe "Estrategia Española de Lucha contra el Cambio Climático". En dicha estrategia se recogen una serie de medidas para minimizar el cambio climático entre las que se incluyen la reducción en el uso de fertilizantes nitrogenados para disminuir la liberación de óxido nitroso y el incremento en el uso de fertilizantes orgánicos para una agricultura sostenible, entre los que se incluyen los biofertilizantes microbianos.

3. Beneficios de las interacciones mutualistas planta microorganismo.

Las relaciones entre plantas y microorganismos se producen desde el mismo origen de las plantas, ya que éstas evolucionaron en un ambiente microbiano muy diverso. Según la teoría endosimbiótica, enunciada por Lynn Margulis a finales de los 60, las plantas superiores adquirieron un nuevo orgánulo, denominado cloroplasto, a partir de la asociación endosimbiótica de cianobacterias con células eucarióticas, que evolucionaron conjuntamente hasta la formación del actual orgánulo funcional. Aunque ésta asociación es la más antigua, existen otros ejemplos de asociaciones simbióticas muy

conocidas, como la formada entre las bacterias fijadoras de Nitrógeno y las leguminosas.

Aún así, las relaciones mutualistas planta microorganismo no están estrictamente limitadas a las bacterias si no que también se establecen con virus, hongos, arqueas, protozoos, etc., es decir, con todo tipo de microorganismos (Mendes *et al.*, 2013) (figura 4). De entre los hongos, las micorrizas arbusculares son los hongos beneficiosos que más se han descrito en asociación con las raíces de plantas (80% de las plantas terrestres).

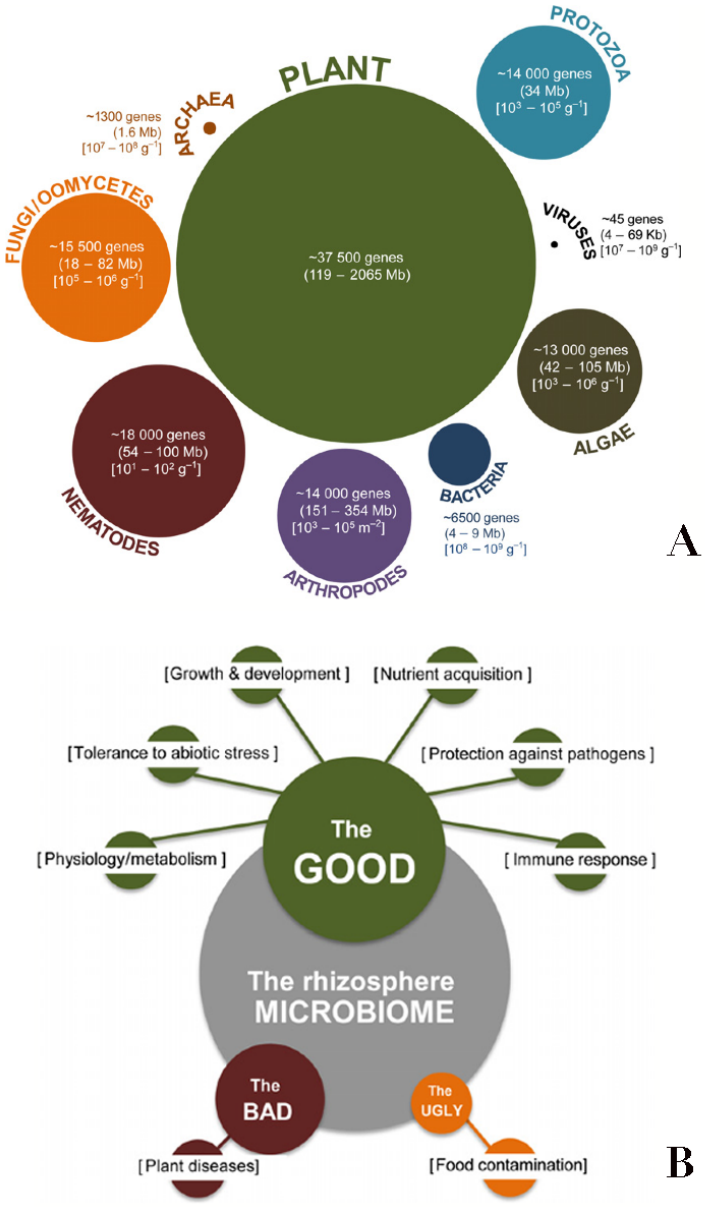


Figura 4. Esquema general de los organismos y microorganismos presentes en la rizosfera (A). Principales funciones e impacto de los microorganismos presentes en la rizosfera (B) (adaptado de Mendes *et al.*, 2013).

Estas interacciones mutualistas se basan en los beneficios que se aportan uno a otro ambos organismos. Las plantas aportan azúcares y un nicho ecológico seguro a los microorganismos, que a su vez, aportan nutrientes (N, P, K, S y otros micronutrientes) y/o protección contra patógenos, aunque éstas relaciones también pueden ser neutras para ambos.

Los microorganismos, entre ellos las bacterias y los hongos, proveen de una serie de ventajas y en ocasiones son cruciales en la supervivencia de las plantas, como por ejemplo,

a) Cruciales en la adquisición de nutrientes.

Las bacterias son los únicos microorganismos conocidos capaces de transformar el Nitrógeno gaseoso en amonio, que constituye la forma orgánica asimilable por las plantas. Las bacterias y los hongos solubilizadores de fosfato producen ácidos orgánicos capaces de captar el fósforo inorgánico y fosfatasas extracelulares que liberan el fosfato e incrementan su disponibilidad para las plantas (Maathuis, 2009). Además, algunas producen sideróforos, los cuales hacen que las formas insolubles de hierro estén disponibles para su utilización por las plantas (Masalha *et al*., 2000).

b) Protegen contra patógenos.

Los biofilms que las bacterias forman alrededor de las raíces de las plantas cuando las colonizan, actúan de barrera contra posibles patógenos. Estas bacterias ocupan los nichos que podrían ser susceptibles de ocupación por dichos patógenos y a su vez, con la formación de los biofilms pueden estimular la respuesta inmune de la planta (Kloepper *et al.*, 2004).

c) Confieren resistencia contra estreses ambientales.

Las bacterias confieren resistencia a estreses tanto ambientales como biológicos (figura 5). Entre otras acciones, las bacterias ayudan a la toma de nutrientes en suelos contaminados, neutralizando los efectos tóxicos de los metales pesados (Andrades-Moreno *et al*., 2014). También mitigan los efectos de las inundaciones, produciendo ACC desaminasas que degradan precursores de la síntesis de etileno, el cual hace que se activen las respuestas de defensa y el desarrollo de la planta se vea afectado (figura 5).

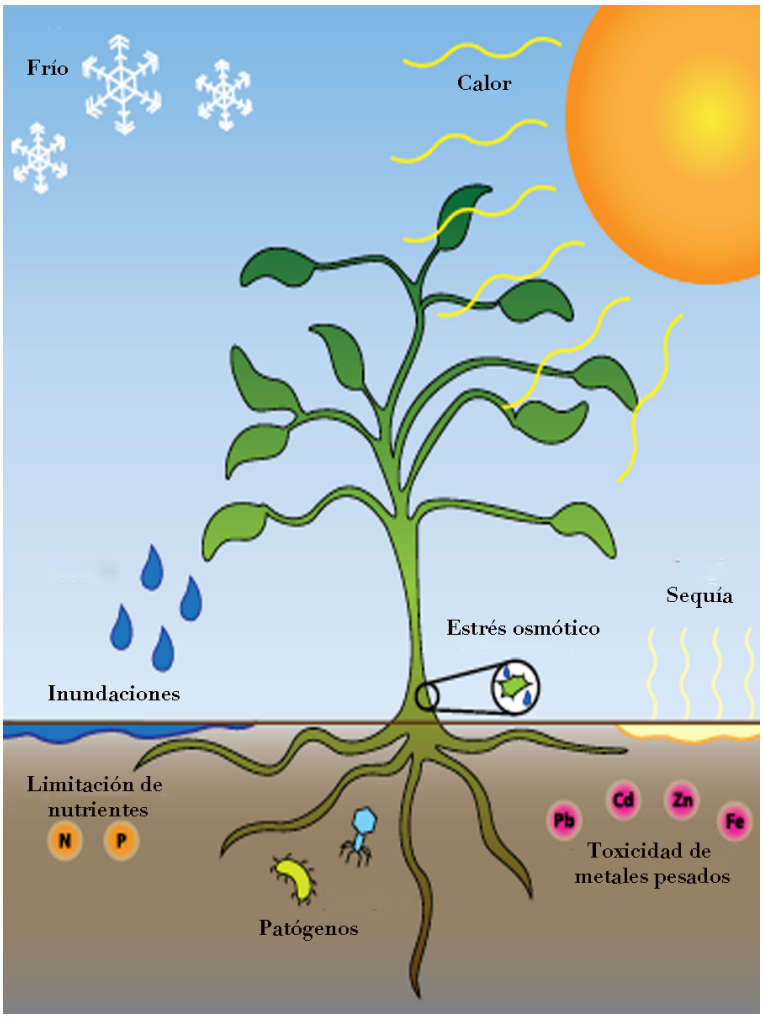


Figura 5. Estreses bióticos y abióticos que afectan a las plantas (adaptado de "How Microbes Can Feed the World", American Academy of Microbiology, 2013).

d) Mejora del desarrollo vegetal.

Las bacterias que establecen relaciones beneficiosas también contribuyen a un mejor desarrollo y crecimiento de la planta. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPBs tienen más de un mecanismo por el cual benefician a la planta (figura 6), incluyendo antagonismo con hongos, producción de sideróforos, fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de ácido indolacético o AIA (auxinas), activación del sistema inmunitario de la planta (ISR) y producción de toda una batería de enzimas (Weyens *et al.*, 2009; Ahemad y Kibret, 2013).

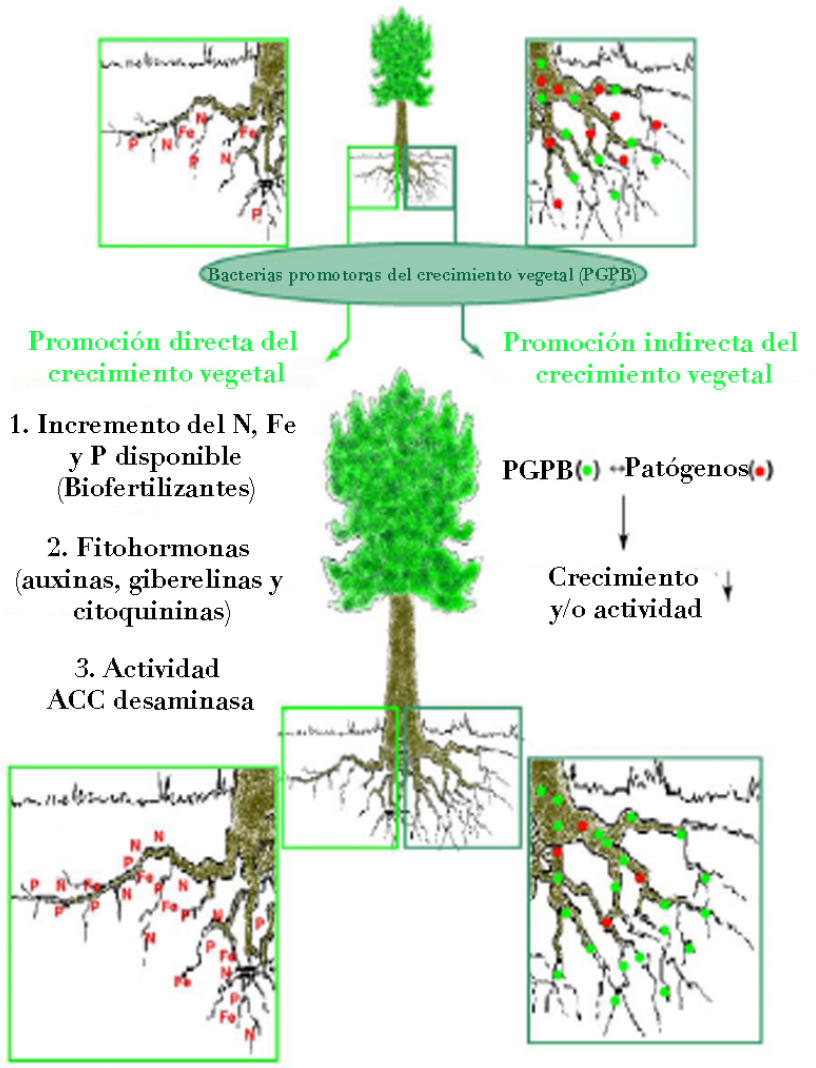


Figura 6. Beneficios de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Weyens *et al.*, 2009).

También existen bacterias que mejoran el sabor de las plantas comestibles. Por ejemplo, *Methylobacterium extorquens* incrementa la producción de 2,5-dimetil-4-hidroxi-2H-furanona (DMHF), responsable del sabor característico de la fresa, al igual que estimula las defensas de la planta, produciendo compuestos antimicrobianos (Zabetakis, 1997).

4. Retos científicos en la optimización de las relaciones planta microorganismo.

Los esfuerzos que la comunidad científica hace para identificar quién es quién en las interacciones planta microorganismo deben ser acompañados por el conocimiento sobre qué parte de la diversidad microbiana existente en la rizosfera es requerida para un óptimo desarrollo vegetal en el medioambiente.

Conocer todos los microorganismos de la rizosfera en diferentes condiciones ambientales es poco factible debido a la dinámica de los sistemas. Aún así, conocer los microorganismos que pueden estar asociados a una planta sí que puede ser factible, utilizando metagenómica. Estas técnicas están bien desarrolladas en bacterias y ya hay estudios que lo describen, por ejemplo en la rizosfera de arroz (Arjun *et al*., 2011) o en la rizosfera de *Lotus japonicus* (Unno *et al*., 2013). Por otro lado, existen bacterias en la rizosfera que se mantienen en muy baja concentración, pudiendo multiplicarse cuando las condiciones ambientales sean favorables. Estas condiciones mediambientales dinámicas son de muy difícil reproducción *in vitro*, por lo que no sería fácil caracterizar este tipo de microorganismos, perdiéndose información.

Determinar qué genotipos específicos de los microorganismos de la rizosfera son óptimos para cada tipo de cultivo también es un gran reto, ya que hay un rango de efectividad, desde los que no son activos a los que incrementan la producción vegetal en diferentes porcentajes.

Otro de los retos científicos sería diseñar un mapa o modelo de interacciones que fuera capaz de predecir cómo diferentes interacciones combinadas puedan dar un determinado fenotipo vegetal. De acuerdo con este reto, también es necesario conocer y/o predecir la evolución de las comunidades microbianas. Así se podría controlar alguno de los factores que puedan afectar el desarrollo vegetal, ya que al trasladar un buen resultado obtenido en el laboratorio y/o invernadero a condiciones de campo, puede que dicho resultado se modifique.

Si bien son importantes los retos anteriormente descritos, el principal reto en el que, actualmente, la comunidad científica está trabajando consiste en la formulación de biofertilizantes adecuados para cada cultivo. Las grandes compañías de producción de fertilizantes químicos están incorporando divisiones para formulación de fertilizantes combinados, biofertilizantes y adyuvantes. Debido a la demanda de la sociedad y de las normativas a nivel global es necesario el esfuerzo de seleccionar géneros, especies y cepas adecuados para cada cultivo, tanto en combinación como un solo microorganismo. A lo largo de los años se ha propuesto el uso de *Rhizobium* como inoculante promotor del crecimiento vegetal en arroz (Yanni *et al*., 2001), maíz (Gutiérrez-Zamora y Martínez-Romero, 2001), en tomate (Santillana *et al*., 2005) o en cultivos hortícolas (Flores-Félix *et al*., 2013), entre otras, además de su uso clásico como simbionte en leguminosas, lo que podría posicionar este género como género clave en la formulación de dichos biofertilizantes.

Para llevar a cabo todos estos retos en optimización de las interacciones planta microorganismo son necesarios avances técnicos como el desarrollo de "ómicas" más rápidas y baratas, una mejor anotación de genomas, la creación de nuevos modelos de estudio adaptados a cada condición o el desarrollo de nuevas técnicas de estudio de la rizosfera, entre otros posibles avances.

Además de estos avances, es estrictamente necesario trasladar estos conocimientos y tecnología a los agricultores, para que lo apliquen en sus cultivos, haciéndoles ver que los biofertilizantes son beneficiosos para ellos y para el medioambiente.

5. Simbiosis fijadora de Nitrógeno.

La capacidad de fijación de Nitrógeno está restringida a procariotas, siendo el Phyllum Proteobacteria el que incluye mayor cantidad de diazotrofos (Kneip *et al*., 2007). Este grupo de microorganismos es muy heterogéneo ya que sus miembros sólo comparten la presencia del complejo enzimático de la nitrogenasa, que reduce Nitrógeno molecular a amonio. De entre ellos, los más importantes en sistemas agrícolas son los miembros del grupo *rhizobia*, que establecen asociaciones simbióticas con leguminosas.

De entre las plantas leguminosas que forman asociaciones simbióticas, la soja (*Glycine max*) es el cultivo dominante, representando el 50% de los cultivos y un 68% de la producción mundial de leguminosas, lo que supone un 77% del total de Nitrógeno fijado por leguminosas. Aún teniendo estos datos, es un reto obtener estadísticas fiables sobre la fijación global de Nitrógeno. Este reto se vuelve más imposible si tenemos en cuenta otros sistemas de producción agrícola, como el arroz (*Oryza sativa*), la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), otros cereales e incluso otros sistemas naturales, como las sabanas. En total, se podría estimar la Fijación Biológica global de Nitrógeno entre 50 y 70 toneladas por año en sistemas agrícolas del mundo (Herridge *et al.*, 2008) (figura 7).

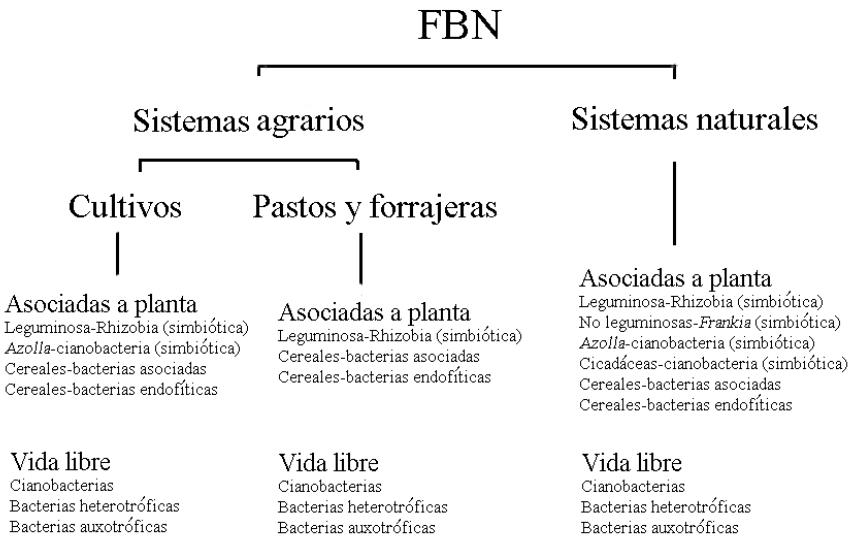


Figura 7. Agentes biológicos fijadores de Nitrógeno en la agricultura y en los sistemas naturales terrestres (modificado de Herridge *et al*., 2008).

Según la asociación simbiótica fijadora de Nitrógeno, es decir, según el tipo de microorganismo y el tipo de la planta que establecezcan una relación simbiótica, las características morfológicas y biológicas varían. Algunas bacterias fijadoras de Nitrógeno como *Azospirillum* y *Klebsiella,* se localizan en vida libre o de forma intercelular en gramíneas (Bashan *et al.,* 2004; Iñiguez *et al*., 2004). También, en vida libre, se encuentran las cianobacterias, importantes simbiontes en los arrecifes de coral (Lesser *et al*., 2004). Existen otras bacterias que pueden penetrar de forma intracelular pero sin formar estructuras especializadas, como *Azoarcus* en arroz (Hurek *et al*., 2002). Además, existen bacterias que penetran en las raíces de forma intracelular, formando estructuras especializadas en determinados puntos de la raíz. Estas estructuras constituyen un nuevo órgano de la planta, denominado nódulo. Este tipo de simbiosis que origina nódulos en plantas, las hace independientes de cualquier otra necesidad del uso de otras fuentes de Nitrógeno (Young, 1992). Esta simbiosis se caracteriza por dos principales hechos evolutivos, la inclusión de la bacteria intracelularmente y la formación de órganos especializados, es decir, los nódulos (Sprent, 2007).

Las bacterias que forman este tipo de estructuras donde se fija Nitrógeno pertenecen al grupo de las Actinobacterias y de los Rizobios, que establecen simbiosis con plantas actinorrícicas y con leguminosas, respectivamente (Benson y Silvester, 1993; Brewin, 1991).

5. 1 Clasificación taxonómica: La familia Rhizobiaceae

En 1888, Beijerinck fué el primero en aislar cultivos bacterianos puros del interior de un nódulo. Observó al microscopio unas bacterias con forma de bacilo, denominándolas *Bacillus radicicola*. En 1938, Conn propuso incluir el género *Rhizobium*, anteriormente descrito por Frank en 1889, en la familia Rhizobiaceae. Este género incluía a todas las bacterias capaces de nodular leguminosas y fue publicado en el Manual de Bergey de 1974, hecho que tuvo un papel crucial en el estudio de la taxonomía de este grupo. Hasta hace 30 años, no se conocían muchas características de esta familia, pero con la llegada de nuevas técnicas bioquímicas y moleculares de identificación, hoy en día conocemos su complejidad y podemos clasificarlas siguiendo diferentes criterios.

Actualmente, su clasificación taxonómica se basa en caracteres fenotípicos y genotípicos. Los rizobios clásicos están dentro del orden Hyphomicrobiales de la Clase α-Proteobacterias, aunque existen otros géneros, denominados no-rizobios, con capacidad de nodular. La mayor parte de estos microorganismos se recogen en las siguientes tablas (tablas 1, 2 y 3).

Tabla 1. Taxonomía rhizobiana, parte 1. Modificado de Weir, B.S. (2012) The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. Fecha actualización: Mayo 2014.

Familia Rhizobiaceae, Orden Rhizobiales, α-Proteobacterias

Género	Especies	Referencias y comentarios	Hospedador
	***Rhizobium* con hospedador específico conocido**		
	R. alamii	Berge *et al.*, 2009	*Medicago ruthenica*
	R. alkalisoli	Lu *et al.*, 2009 a	*Caragana intermedia*
Rhizobium	*R. cellulosilyticum*	García-Fraile *et al.*, 2007	*Medicago sativa*
	R. daejeonense	Quan *et al.*, 2005	*Medicago spp*
(Frank, 1889)	*R. endophyticum*	López-López *et al.*, 2011	*Phaseolus vulgaris*
	R. fabae	Tian *et al.*, 2008	*Vicia faba*
	R. etli	Segovia *et al.*, 1993	*Phaseolus vulgaris*
	R. galegae	Lindström, 1989	*Galega officinalis*
	R. gallicum	Amarger *et al.*, 1997	*Phaseolus vulgaris*
	R. giardinii	Amarger *et al.*, 1997	*Phaseolus vulgaris*
	R. hainanense	Chen *et al.*, 1997	*Desmodium spp, Styloshantes guyanansis, Centrosema pubescens, Tephrosia candida, Acacia sinuata, Arachis hypogaea, Zornia diphylla, Uraria crinita, Macroptillium lathyroides*
	R. herbae	Ren *et al.*, 2011 b	*Astragalus membranaceus, Osytropis cashemiriana*
	R. huautlense	Wang *et al.*, 1998	*Sesbania herbacea*
	R. indigoferae	Wei *et al.*, 2002	*Indigofera spp., Kummerowia stipulacea*
	R. pusense	Panday *et al.*, 2011	*Cicer arietinum*
	R. leguminosarum	Frank (1879, 1889); Ramírez-Bahena *et al.*, 2008	*Pisum sativum, Trifolium repens*
	R. loessense	Wei *et al.*, 2003	*Astragalus spp, Lespedeza sp.*
	R. lusitanum	Valverde *et al.*, 2006	*Phaseolus vulgaris*
	R. mesosinicum	Lin *et al.*, 2009	*Albizia sp, Kummerowia spp, Dalbergia spp*
	R. lupini	Eckhardt *et al.*, 1931	*Lupinus spp*
	R. miluonense	Gu *et al.*, 2008	*Lespedeza chinensis*
	R. halophytocola	Bibi *et al.*, 2012	*Vigna unguiculata, Pisum sativum*
	R. mongolense	Van Berkum *et al.*, 1998	*Medicago ruthenica*
	R. multihospitium	Han *et al.*, 2008 b	*Robinia pseudoacacia, Lotus spp, Alhagi toum, Astreagalus spp, Halimodendrom halodendron, Oxytropis spp, Sophora alopecuroides, Caragana jubata, Lathyrus odoratus, Vicia hirsuta*
	R. oryzae	Peng *et al.*, 2008	*Phaseolus vulgaris, Glycine max*
	R. petrolearium	Zhang *et al.*, 2012 b	*Medicago sativa*
	R. phaseoli	Dangeard *et al.*, 1926; Ramírez-Bahena *et al.*, 2008	*Phaseolus, Trifolium*
	R. leucaneae	Ribeiro *et al.*, 2012	*Leucaena leucocephala, Phaseolus vulgaris*
	R. pisi	Ramirez-Bahena *et al.*, 2008	*Pisum sativum*
	R. tibeticum	Hou *et al.*, 2009	*Trigonella archiducis-nicolai*
	R. yanglingense	Tan *et al.*, 2001	*Amphicarpaea trisperma, Coronilla varia, Gueldenstaedtia multiflora*
	R. sullae	Squartini *et al.*, 2002	*Hedysarum coronarium*
	R. tropici	Martínez-Romero *et al.*, 1991	*Phaseolus vulgaris, Leucaena leucocephala*
	R. tubonense	Zhang *et al.*, 2011 b	*Oxytropis glabra*
	R. undicola	deLajudie *et al.*, 1998; Young *et al.*, 2001	*Neptunia natans*
	R. vignae	Ren *et al.*, 2011 a	*Vigna radiata*
	R. taibaishanense	Yao *et al.*, 2012	*Kummerowia striata*
	R. vallis	Wang *et al.*, 2011	*Mimosa pudica, Phaseolus vulgaris, Indigofera spicata*
	R. mesoamericanum	López-López et al., 2012	*Phaseolus vulgaris, Macroptillium atropurpureum, Vigna unguiculata, Mimosa pudica*
	R. soli	Yoon *et al.*, 2010	*Amphicarpaea spp*
	R. sphaerophysae	Xu *et al.*, 2012	*Sphaerophysa salsula*
	R. qilianshanense	Xu *et al.*, 2013	*Oxytropis ochrocephala*
	R. helanshanense	Qin *et al.*, 2012	*Sphaerophysa salsula*
	R. grahamii	López-López *et al.*, 2012	*Dalea leporina, Leucaena leucocephala Clitoria ternatea*

Tabla 1. Continuación

Familia Rhizobiaceae, Orden Rhizobiales, α-Proteobacterias

Género	Especies	Referencias	Hospedador y /o fuente
Rhizobium (Frank, 1889)	*R. cauense*	Liu *et al*., 2012a	*Kummerowia stipulacea*
	R. calliandrae	Rincón-Rosales *et al.*, 2013	*Calliandra grandiflora*
	R. mayense	Rincón-Rosales *et al.*, 2013	*Calliandra grandiflora*
	R. jaguaris	Rincón-Rosales *et al*., 2013	*Calliandra grandiflora*
	R. azibense	Mnasri *et al*., 2014	*Phaseolus vulgaris*
	R. endolithicum	Parag *et al*., 2013	*Glycine max*
	R. pongamiae	Kesari *et al.*, 2013	*Pongamia pinnata*
	R. freirei	Dall´Agnol *et al*., 2013	*Phaseolus vulgaris*
	R. laguerreae	Saidi *et al.*, 2014	*Vicia spp.*
	***Rhizobium* sin hospedador específico conocido**		
	R. rhizoryzae	Zhang *et al*., 2014	Desconocido, aislado de raíces de arroz
	R. flavum	Gu et al., 2014	Desconocido, aislado de suelo tratado con productos fitosanitarios
	R. tarimense	Turdahon *et al.*, 2013	Desconocido, aislado de suelo
	R. aggregatum	Kaur *et al.*, 2011	Desconocido, aislado de las aguas superficiales de un lago
	R. halotolerans	Diange and Lee, 2013	Desconocido, aislado de suelo contaminado con cloretileno
	R. lemnae	Kittiwongwattana and Thawai, 2014	Desconocido, endófito de *Lemna aequinosctialis*
	R. paknamense	Kittiwongwattana and Thawai., 2013	Desconocido, endófito de *Lemna aequinosctialis*
	R. kunmingense	Shen *et al*., 2010	Desconocido, aislado de rizosfera de Camptotheca acuminata
	R. naphthalenivorans	Kaiya *et al*., 2012	Desconocido, aislado de sedimentos contaminados
	R. phenanthrenilyticum	Wen *et al*., 2012	Desconocido, sinómimo de *R. petrolearium*
	R. subbaraonis	Ramana *et al*., 2013	Desconocido, aislado de arena de playa
	R. nepotum	Pulawska *et al.*, 2012	Desconocido, aislado de agallas de *Prunus cerasifera, Rubus idaeus, Vitis vinifera, Prunus avium*
	R. skierniewicense	Pulawska *et al.*, 2012	Desconocido, aislado de tumors de *Chrysantemum spp, Prunus cerasifera*
	R. selenitireducens	Hunter *et al.*, 2008	Desconocido, aislado de un biorreactor
	R. borbori	Zhang *et al.*, 2011a	Desconocido, aislado de fangos activos
	R. rosettiformans	Kaur *et al.*, 2011	Desconocido, aislado de un vertedero de hexaclorociclohexanos
	R. pseudoryzae	Zhang *et al.*, 2011 c	Hospedador desconocido, aislada de rizosfera de *Oryza sativa*
	A. vitis =R. vitis	Ophel and Kerr, 1990; Young *et al*., 2001	Desconocido, aislado de tumores de *Vitis vinifera*
	A. larrymoorei = R. larrymoorei	Bouzar and Jones, 2001; Young, 2004	Desconocido, aislado de tumores aéreos de *Ficus benjamina*
	A. rhizogenes =R. rhizogenes	Riker *et al.*, 1930; Young *et al.*, 2001	Desconocido, aislado de raíces en cabellera de *Prunus malus*
	A. rubi =R. rubi	Hildebrand, 1940; Young *et al.*, 2001	Desconocido, aislado de agallas de *Rubus*
	A. radiobacter/ A. tumefaciens =R. radiobacter	Beijerinck and van Delden, 1902; Sawada *et al*., 1993; Young *et al*., 2011	Desconocido, aislado de suelo

Tabla 1. Continuación

Familia Rhizobiaceae, Orden Rhizobiales, α-Proteobacterias

Género	Especie	Referencia	Hospedador y/o fuente
Ensifer Anterior *Sinorhizobium.* (Casida, 1982; Chen *et al.*, 1988) Muchas de ellas se renombraron en Young, 2003.	*Ensifer chiapanecum*	Rincón-Rosales *et al.*, 2009	*Acaciella*
	Ensifer psoraleae	Wang *et al*., 2013 c	*Psoralea coryfolia, Sesbania cannabina*
	Ensifer sesbaniae	Wang *et al*., 2013 c	*Sesbania cannabina, Medicago lupulina*
	Ensifer morelense	Wang *et al*., 2002; Wang *et al*., 2013 c	*Medicago lupulina*
	Ensifer americanum	Toledo *et al.*, 2003; Wang *et al*., 2013 c	*Acacia spp*
	Ensifer arboris	Nick et al., 1999; Young *et al.*, 2003	*Acacia spp, Prosopis chilensis*
	Ensifer fredii	Scholla and Elkan, 1984; Jarvis *et al*., 1992; Young, 2003	*Glycine max*
	Ensifer garamanticus	Merabet *et al.*, 2010	*Medicago sativa, Argyrolobium uniflorum*
	Ensifer indiaense	Ogasawara, *et al.*, 2003	*Sesbania rostrata, Abrus pecatorius*
	Ensifer kostiensis	Nick *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2003	*Acacia spp, Prosopis chilensis*
	Ensifer kummerowiae	Wei *et al*., 2002; Young, 2003	*Kummerowia stipulacea*
	Ensifer medicae	Rome *et al*., 1996; Young, 2003	*Medicago truncatula*
	Ensifer meliloti	Dangeard, 1926; deLajudie *et al*., 1994; Young, 2003	*Medicago sativa*
	Ensifer mexicanus	Lloret *et al.*, 2011	*Acacia angustissima*
	Ensifer morelense	Wang *et al*., 2002; Wang *et al*., 2013 c	*Leucaena leucocephala*
	Ensifer adhaerens	Casida, 1982	*Lotus arabicus*
	Ensifer numidicus	Merabet *et al.*, 2010	*Argyrolorium uniflorum, Lotus creticus*
	Ensifer saheli	deLajudie *et al*., 1994; Young, 2003)	*Acacia spp, Sesbania spp.*
	Ensifer sojae	Li *et al.*, 2011	*Glycine max*
	Ensifer terangae	deLajudie *et al*., 1994; Young, 2003	*Acacia spp, Sesbania spp.*
Shinella	*Shinella kummerowiae*	Lin *et al.*, 2008	*Kummerowia stipulacea*

Tabla 2. Taxonomía rhizobiana, parte 2. Modificado de Weir, B.S. (2012) The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. Fecha actualización: Mayo 2014.

Orden Hyphomicrobiales, α-Proteobacterias, distintas familias

Genero	Especies	Referencias y comentarios	Hospedador
Mesorhizobium (Jarvis *et al.*, 1997)	*M. albiziae*	Wang *et al.*, 2007	*Albizia kalkora*
	M. alhagi	Chen *et al.*, 2010	*Alhagi sparsifolia*
	M. amorphae	Wang *et al.*, 2002 b	*Amorpha fruticosa*
	M. australicum	Nandasena *et al.*, 2009	*Biserrula pelecinus*
	M. camelthorni	Chen *et al.*, 2011	*Alhagi sparsifolia*
	M. caraganae	Wang *et al.*, 2007	*Caragana spp.*
	M. chacoense	Velazquez *et al.*, 2001	*Prosopis alba*
	M. ciceri	Nour *et al*., 1994; Jarvis *et al*., 1997	*Cicer arietinum*
	M. gobiense	Han *et al.*, 2008	*Astragalus filicaulis, Lotus spp, Oxytropis glabra*
	M. sangaii	Zhou *et al*., 2013	*Astragalus luteolus*
	M. tamadayense	Ramirez-Bahena *et al.*, 2012	*Anagyris latifolia, Lotus berthelotii*
	M. silamurunense	Zhao *et al*., 2012	*Astragalus, Caragana intermedia*
	M. shonense	Degefu *et al*., 2013	*Acacia abyssinica*
	M. muleiense	Zhang *et al*., 2012	*Cicer arietinum*
	M. hawassense	Degefu *et al*., 2013	*Sesbania sesban*
	M. abyssinicae	Degefu *et al*., 2013	*Acacia abyssinica*
	M. silamurunense	Zhao *et al.*, 2012	*Astragalus spp.*
	M. huakuii	Chen *et al.*, 1991; Jarvis *et al*., 1997	*Astragalus sinicus*
	M. loti	Jarvis *et al*., 1982; Jarvis *et al*., 1997	*Lotus spp.*
	M. mediterraneum	Nour et al., 1995; Jarvis *et al.*, 1997	*Cicer arietinum*
	M. metallidurans	Vidal *et al.*, 2009	*Anthyllis vulneraria*
	M. opportunistum	Nandasena *et al.*, 2009	*Biserrula pelecinis*
	M. qingshengii	Zheng *et al*., 2013	*Astragalus sinicus*
	M. plurifarium	de Lajudie *et al.*, 1998 b	*Acacia spp, Prosopis juliflora, Chamaecrista ensiformis, Leucaena spp*
	M. robiniae	Zhou *et al.*, 2010	*Robinia pseudoacacia*
	M. shangrilense	Lu *et al.*, 2009	*Caragana spp.*
	M. septentrionale	Gao *et al.*, 2004	*Astragalus adsurgens*
	M. tarimense	Han *et al.*, 2008	*Lotus frondosus*
	M. sangaii	Zhou *et al.*, 2013	*Astragalus spp*
	M. temperatum	Gao *et al.*, 2004	*Astragalus adsurgens*
	M. tianshanense	Chen *et al.*, 1995; Jarvis *et al*., 1997	*Sophora alopecuroides, Glycyrrhiza sp, Halimodendron holodendron, Caragana polourensis, Swainsonia salsula, Glycine spp*
Bradyrhizobium (Jordan, 1982)	*B. canariense*	Vinuesa *et al*., 2005	*Genista spp, Chamaecytisus proliferans*
	B. denitrificans	van Berkum *et al*., 2011	*Aeschynomene indica*
	B. daqingense	Wang *et al*., 2013	*Glycine max*
	B. elkanii	Kuykendall *et al*., 1993	*Glycine max*
	B. iriomotense	Islam *et al*., 2008	*Macroptyllium atropurpureum*
	B. japonicum	Kirchner, 1896; Jordan, 1982	*Glycine max*
	B. jicamae	Ramírez-Bahena *et al.*, 2009	*Pachyrhizus erosus*
	B. liaoningense	Xu *et al*., 1995	*Glycine max*
	B. pachyrhizi	Ramírez-Bahena *et al*., 2009	*Pachyrhizus erosus*
	B. cytisi	Chahboune *et al.*, 2011	*Cytisus villosus*
	B. huanghuaihaiense	Zhang *et al.*, 2012	*Glycine max*
	B. lablabi	Chang *et al*., 2011	*Arachis hypogaea, Lablab purpureus*
	B. arachidis	Wang *et al*., 2013 b	*Arachis hypogaea*
	B. diazoefficiens	Delamuta *et al.*, 2013	*Glycine max*
	B. ganzhouense	Lu *et al*., 2014	*Acacia melanoxylon*
	B. icense	Duran *et al*., 2014	*Phaseolus lunatus*
	B. manausense	Venancio-Silva *et al*., 2014	*Vigna unguiculata*
	B. paxllaeri	Duran *et al.*, 2014	*Phaseolus lunatus*
	B. retamae	Guerrouj *et al*., 2013	*Retama spp*
	B. rifense	Chahboune *et al*., 2012	*Cytisus villosus*
	B. yuanmingense	Yao *et al*., 2002	*Lespedeza*
Azorhizobium (Dreyfus *et al.*, 1988)	*A. caulinodans*	Dreyfus *et al*., 1988	*Sesbania rostrata*
	A. doebereinerae	Souza-Moreira *et al*., 2005	*Sesbania virgata*

Tabla 3. Taxonomía rhizobiana, parte 3. Modificado de Weir, B.S. (2012) The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. Fecha actualización: Mayo 2014.

Otros géneros de α y β Proteobacteria

Género	Especie	Referencias y comentarios	Hospedador
Burkholderia Gillis *et al.*, 1995	*B. heleia*	Aizawa *et al.*, 2010	*Eleocharis dulcis*
	B.symbiotica	Sheu *et al.*, 2012	*Mimosa spp*
	B.cepacia	Rasolomampianina *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2012	*Dalbergia spp*
	B.mimosarum	Chen *et al.*, 2006	*Mimosa pigra*
	B.nodosa	Chen *et al.*, 2007; Bournaud *et al.*, 2013	*Mimosa spp, Piptadenia spp, Parapiptadenia spp. Pseudopiptadenia contorta*
	B.diazotrophica	Sheu *et al.*, 2013; Bournaud *et al.*, 2013	*Mimosa spp, Anadenanthera sp, Parapiptadenia blanchetti*
	B.phymatum	Vandamme *et al.*, 2002; Elliot *et al.*, 2007b; Talbi *et al.*, 2010; Bournaud *et al.*, 2013	*Machaerium spp, Mimosa spp, Parapiptadenia pterosperma, Phaseolus vulgaris*
	B.sabiae	Chen *et al.*, 2008; Bournaud *et al.*, 2013	*Mimosa caesalpiinifolia, Piptadenia trisperma, Anadenanthera peregrina, Parapiptadenia sp, Pseudopiptadenia bahiana*
	B.caballeronis	Martínez-Aguilar *et al.*, 2013	*Phaseolus vulgaris*
	Burkholderia sp.	Taulé *et al.*, 2012; Howieson *et al.*, 2013; Bournaud *et al.*, 2013	*Parapiptadenia rigida, Lebeckia anbigua, Piptadenia sp, Microlobius foetidus*
	B. sprentiae	De Meyer *et al.*, 2013 a	*Lebeckia anbigua*
	B. rhynchosiae	De Meyer *et al.*, 2013 b	*Rhynchosia ferulifolia*
	B. phenoliruptrix	Bournaud *et al.*, 2013	*Piptadenia spp, Anadenanthera spp*
	B.andropogonis	Coenye *et al.*, 2001	*Trifolium repens, Trifolium pratense, Cicer arietinum*
	B. dilworthii	De Meyer *et al.*, 2014	*Lebeckia ambigua*
	B. caribensis	Liu *et al.*, 2011; Bournaud *et al.*, 2013	*Mimosa spp, Parapiptadenia rigida*
	B.tuberum	Vandamme *et al.*, 2002; Elliot *et al.*, 2007b; Barret and Parker, 2006; Gyaneshwar *et al.*, 2011	*Macroptilium atropurpureum,*
Phyllobacterium	*P. trifolii*	Valverde *et al.*, 2005	*Trifolium repens, Lupinus albus*
Ochrobactrum	*O. ciceri*	Imran *et al.*, 2010	*Cicer arietinum*
	O. cytisi	Zurdo-Piñeiro *et al.*, 2007	*Cytisus scoparius*
	O. lupini	Trujillo *et al.*, 2005	*Lupinus albus*
Methylobacterium	*M. trifolii*	Wellner *et al.*, 2013	*Trifolium repens*
	M. nodulans	Jourand *et al.*, 2004	*Crotalaria spp.*
Microvirga	*M. lupini*	Ardley *et al.*, 2011	*Lupinus texensis*
	M. vignae	Radl *et al.*, 2014	*Vigna unguiculata*
	M. lotononidis	Ardley *et al.*, 2011	*Listia angolensis*
	M. zambiensis	Ardley *et al.*, 2011	*Listia angolensis*
Cupriavidus	*C. necator*	da Silva *et al.*, 2012	*Phaseolus vulgaris, Leucaena leucocephala, Macroptillium atropurpureum, Vigna unguiculata*
	C. taiwanensis	Chen *et al.*, 2003a; Vandamme and Coenye, 2004; Parker and Barret, 2006; Verma *et al.*, 2004; Andam *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011	*Mimosa spp.*
Devosia	*D. yakushimensis*	Bautista *et al.*, 2010	*Pueraria lobata*
	D. neptuniae	Rivas *et al.*, 2002	*Neptunia natans*

Dentro de todas ellas, la familia Rhizobiaceae incluye varios géneros muy heterogéneos fenotípicamente hablando. De entre ellos, el género *Ensifer* y el género *Rhizobium* tienen un especial interés en estudios simbióticos.

5. 1. 1 El género *Rhizobium.*

El género *Rhizobium* fué descrito for Frank en 1889. Estos microorganismos son bacilos Gram negativos con un tamaño que oscila entre 0,5 y 0,9 µm de ancho y 1,2 a 3,0 µm de largo. Son móviles en las etapas de crecimiento logarítmico y poseen flagelos. En su gran mayoría producen una matriz polisacarídica densa de composición variable, según la cepa.

Generalmente, los rizobios de este género nodulan leguminosas de climas templados como *Phaseolus*, *Trifolium*, *Lens*, *Vicia* y *Pisum.* Los genes que determinan su especificidad se encuentran por lo general en plásmidos simbióticos que pueden ser transferidos a otros microorganismos de la rizosfera, pudiéndose ampliar el rango de especificidad por un hospedador concreto.

Actualmente, el género *Rhizobium* consta de 73 especies (ver tabla 1), aunque algunas de ellas no se le conoce su hospedador específico puesto que están aisladas de sistemas de tratamiento de residuos petrolíferos, como *Rhizobium phenanthrenilyticum* (Wen *et al.,* 2011) o de aguas contaminadas con hexaclorociclohexano de una localidad de La India, como *Rhizobium rosettiformans* (Kaur *et al*., 2011).

Muchas de las especies del Género *Rhizobium* tienen actualmente secuenciado todo su genoma, como por ejemplo, *R. leguminosarum* bv viciae 3841 (Young *et al.,* 2006), *R. etli* CFN42 (González *et al*., 2006) o *R. leguminosarum* bv trifolii WSM1325 (Reeve *et al*., 2010), entre otras. Asimismo, muchas de ellas también tienen secuenciado todo su replicoma, incluídos los plásmidos simbióticos (figura 8).

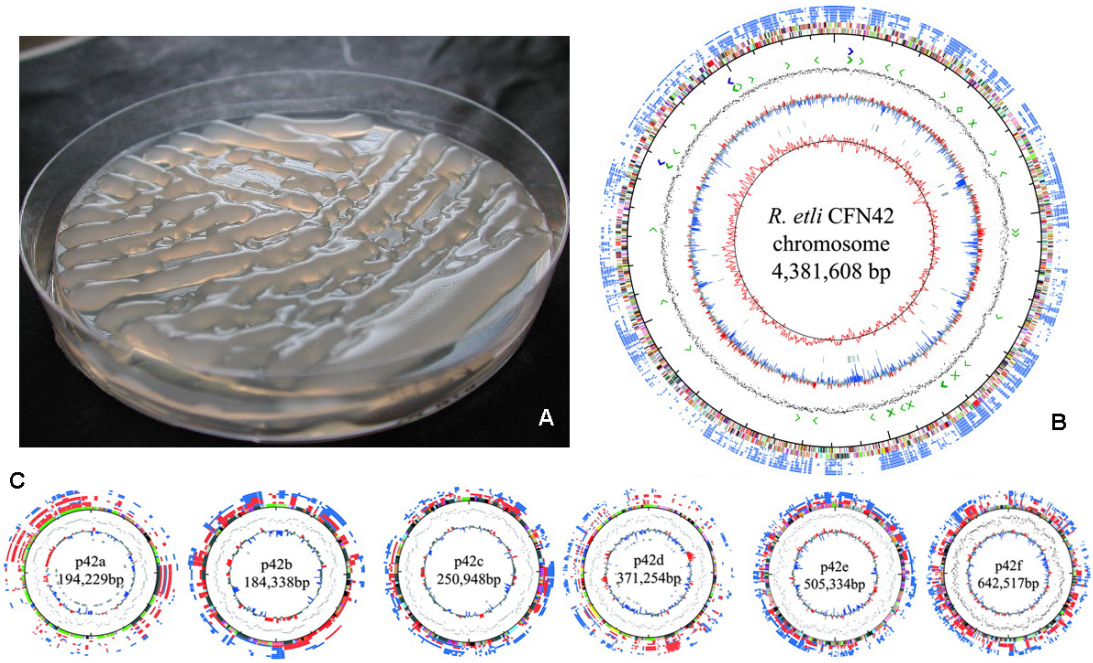


Figura 8. Morfología de un cultivo en placa de *Rhizobium* (A). Cromosoma (B) y plásmidos (C) de *Rhizobium etli* CFN42, cepa con su replicoma totalmente secuenciado.

5. 1. 2 El género *Ensifer (Sinorhizobium).*

Las bacterias de este género son bacilos Gram negativos con un tamaño que puede oscilar de 0,5 a 1,0 µm de ancho y 1,2 a 3,0 µm de largo. Son móviles gracias a la presencia de un flagelo polar o subpolar y de 1 a 6 flagelos peritricos. También produce una matriz polisacarídica mucosa, aunque ésta se reduce o aumenta considerablemente dependiendo de la cepa y del medio en el que se cultive.

El género *Sinorhizobium* fue descrito por Chen y colaboradores en el año 1988. Sin embargo, varios estudios recientes muestran que este género y *Ensifer*, descrito por Casida y colaboradores en el año 1982, pertenecen al mismo taxón. El género *Ensifer* fue descrito primero, por lo que tiene prioridad en el nombre (Young, 2003). Esto significa que el género *Sinorhizobium* debe ser renombrado como *Ensifer* y aunque ha habido discusiones reflejadas en la literatura (Young, 2010), en este trabajo hemos decidido utilizar *Ensifer* como opción correcta, según las normas del Comité Internacional de Sistemática en Procariotas (ICSP).

El género se compone de 19 especies descritas, las cuales suelen nodular leguminosas de los géneros *Medicago, Trigonella* y *Melilotus*. Algunas pueden nodular otras leguminosas de interés alimentario, como *Glycine* (soja) y *Phaseolus* (alubia).

E. meliloti es la especie más utilizada en estudios en simbiosis, sobre todo la cepa 1021 (Meade *et al*., 1982), cuyo genoma está completamente secuenciado (Galibert *et al*., 2001) y es de fácil manejo por su escasa mucosidad, ya que es deficiente en producción de exopolisacárido (Glazebrook and Walker, 1989). Su hospedador habitual es *Medicago sativa* (alfalfa).

E. meliloti 1021 es un mutante espontáneo, resistente a estreptomicina, derivado de *E. meliloti* 2011. Ambas cepas provienen de la cepa parental SU47 (Brockwell y Hely, 1966). La cepa 1021 presenta valores subóptimos de fijación de Nitrógeno en simbiosis con la leguminosa modelo *M. truncatula*, presentando nódulos infectivos pero poco efectivos y valores de peso seco y Nitrógeno por planta mucho menores que los obtenidos para *E. medicae* WSM419, que resultó ser la mejor fijadora para esta leguminosa modelo, ofreciendo la oportunidad de estudiar esta interacción simbiótica con una alta eficiencia (Terpolilli *et al*., 2008).

E. medicae WSM419 se aisló en un primer momento de un nódulo de *M. murex* recolectado en Cerdeña (Italia) en 1981. Esta cepa se ha utilizado de forma general en Australia como inoculante en forrajeras, sobre todo entre los años 1985 y 1993, debido a su potencial en fijación de Nitrógeno, su competitividad y su tolerancia a estreses. Su genoma consta de un cromosoma de 6.817.576 pb y 3 plásmidos simbióticos: pSMED01 (1.570591 pb), pSMED02 (1.245.408 pb) y pSMED03 (219.313 pb). Éste último plásmido es único de este endosimbionte de *Medicago* (Reeve *et al*., 2010) (figura 9).

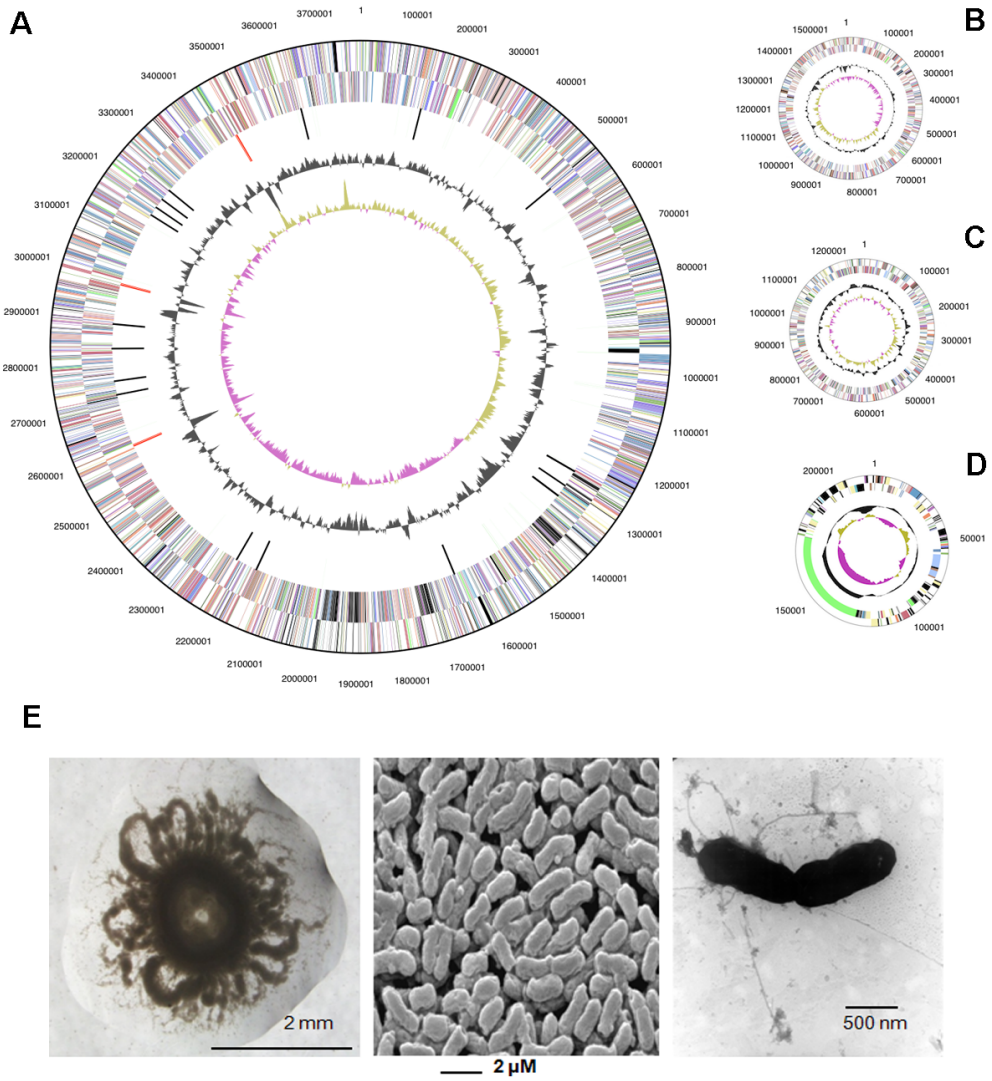


Figura 9. Morfología de las bacterias del género *Ensifer*, en concreto de la cepa *Ensifer medicae* WSM419 (E). Cromosoma (A) y plásmidos (B, C, D), los cuales se encuentran completamente secuenciados (adaptado de Reeve *et al*., 2010).

5. 2 La familia Fabaceae.

La familia Fabaceae es una de las mayores familias dentro de las plantas angiospermas. Esta familia está ampliamente distribuida por toda la geografía mundial. Es la segunda familia vegetal en importancia económica, por detrás de la familia Poaceae. Consta de tres subfamilias Faboideae o Papilionoideae, Mimosoideae y Caesalpinioiedae, aunque esta división se basa principalmente en diferencias florales (Taubert, 1894) (figura 10). Dentro de las dos primeras familias, existen numerosas especies que tienen la capacidad de fijar Nitrógeno en simbiosis con bacterias fijadoras o rizobios. Por el contrario, en la tercera subfamilia esta asociación no es usual (Sprent, 2007), existiendo numerosas asociaciones singulares como por ejemplo, la asociación formada entre *Dimorphandra wilsonii*, un árbol en peligro de extinción perteneciente a

ésta última familia, y *Bradyrhizobium sp.*, que es el endosimbionte encontrado en el interior de sus nódulos (Fonseca *et al*., 2012).

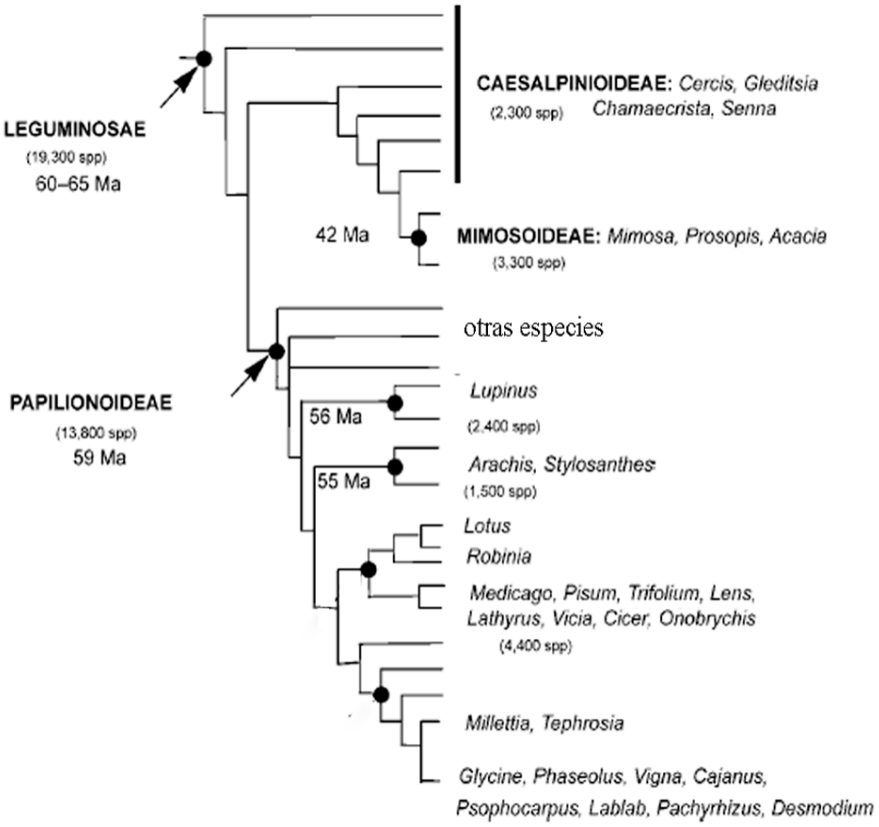


Figura 10. Árbol filogenético de la familia Fabaceae, modificado de Gepts *et al*., 2005.

Las leguminosas pueden ser árboles, arbustos o hierbas anuales o perennes (figura 11). Tienen hojas compuestas alternas y la estructura de la flor varía entre las 3 subfamilias pero el fruto es característico de todas ellas, denominado "pod" o vaina, que puede ser dehiscente o indehiscente.



Figura 11. Diversidad de leguminosas. *Acacia angustissima* (A), *Astragalus lindheimeri* (B), *Desmodium paniculatum* (C), *Trifolium incarnatum* (D), *Sesbania vesicaria* (E), *Strophostyles helvola* (F), *Melilotus officinalis* (G), *Vicia villosa* (H) y *Psoralea hypogaea* (I) (fotografías tomadas de la Samuel Roberts Noble Foundation).

Las subfamilias Mimosoideae y Caesalpinioideae, que suelen abundar en climas tropicales, son muy apreciadas como plantas ornamentales pero también son fuente para la producción de resinas, taninos, tintes, insecticidas, medicamentos… Numerosos miembros de la subfamilia Papilionoideae, típica de climas templados, son económicamente importantes debido a su uso en alimentación tanto en humanos como en animales. No en vano, la soja es el cultivo mayoritario de leguminosas según los datos mundiales de producción de la FAO en 2012.

Su capacidad de fijar Nitrógeno en simbiosis las hace unas excelentes especies pioneras. También pueden ser utilizadas en remediación de suelos los miembros de los géneros *Medicago, Trifolium* y *Lupinus*. Su uso en rotación de cultivos y como abono verde puede llegar a sustituir total o parcialmente el uso de fertilizantes químicos nitrogenados. Para llegar a esto, son necesarios mejores programas de cultivo, uso de nuevas tecnologías y enfatizar en su estudio como agentes de defensa, fijadores de Nitrógeno y tolerancia a estreses. Además, se requiere una optimización y extensión en el uso de

tecnologías de bajo coste, como lo es la inoculación con rizobios. Todo esto conllevará beneficios en producción agrícola, sobre todo, en lo referente a pequeños agricultores (Graham y Vance, 2003).

La singularidad de las leguminosas se centra en la aparición de nódulos en sus sistemas radicales que, aunque parece constante en la familia, no es una capacidad ubicua en ella. Aún así, en 1860, Wydler consideró la formación de nódulos como un buen diagnóstico para su clasificación taxonómica. Este fenómeno denominado nodulación no ocurre si en la rizosfera no existe un rizobio compatible.

5. 2. 1 El género *Trifolium*

El género *Trifolium* fué descrito por Linneo en 1753, dentro de las Papilonáceas. Este género comprende unas 240 especies en el mundo, de las que se encuentran 60 en la Península Ibérica. Generalmente se encuentran en climas templados. Son plantas herbáceas, anuales o perennes y sus hojas están formadas por tres folíolos, con estípulas en la base del pecíolo y al menos parcialmente soldadas. Las inflorescencias están generalmente formadas por muchas flores, formando cabezuelas o espigas compactas, de color rosado, púrpura, amarillo o blanco (figura 12). El fruto generalmente indehiscente, incluido o no en el cáliz, por lo general tiene pocas semillas.

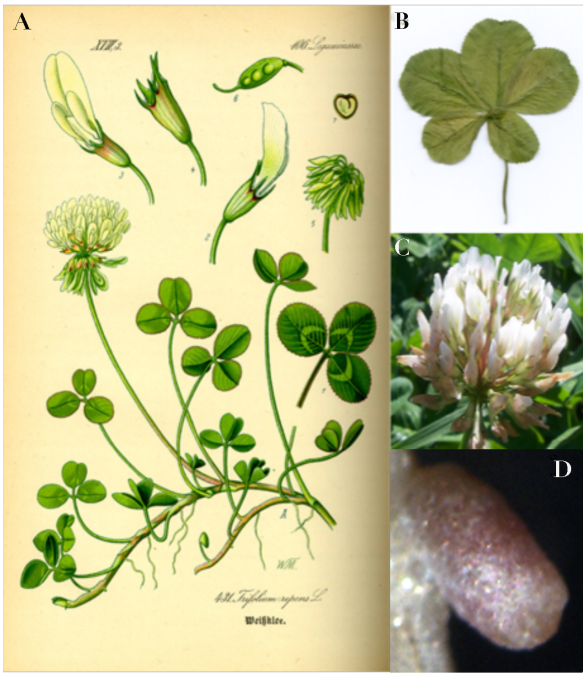


Figura 12. Leguminosas del género *Trifolium*; esquema de *Trifolium repens* L., con detalle de flores, semillas y vainas (A). Mutaciones en el genoma de la planta pueden influir, por ejemplo, en el número de hojas (trébol de cuatro o cinco hojas) (B). Detalle de la flor de trébol blanco (C) y de un nódulo indeterminado típico fijador (D).

Algunas especies como *Trifolium pratense* o *T. repens*, tienen interés para el ganado, como componentes de praderas naturales o sembradas en praderas artificiales para producir forraje.

Poseen nódulos indeterminados (figura 12 D). Se ha observado nodulación en el 52% de las especies. Entre las bacterias que forman nódulos en trébol encontramos *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii y *Phyllobacterium trifolii*.

Dentro de éste género, el trébol blanco o *Trifolium repens* es ampliamente utilizado en producción de forraje. Su principal utilización es el pastoreo a diente en mezcla con gramíneas (*Festuca, Dactylis*…), a las cuales suministra grandes cantidades de nitrógeno, el cual se ha fijado en sus nódulos radicales. También se utiliza en rotación de cultivos, por ejemplo en el Delta del Nilo en rotación con arroz.

La variedad Huia es considerada en España como la leguminosa más productiva para pastoreo en áreas de más de 650 mm de lluvia y de no más de tres semanas de sequía en verano. Es dura y persistente, incluso con pastoreo continuo e intenso. Su óptimo de temperatura son 24 °C, pero tiene escasa producción invernal.

5. 2. 2 El género *Medicago.*

El género *Medicago* fue descrito por Linneo en 1754, dentro de la subfamilia Papilionoidae. Consta de alrededor de 80 especies distribuidas en zonas de climas templados, algunas de ellas se consideran como especies sinónimas, es decir, podrían ser la misma especie ya que no está clara su clasificación (según International Legume Database & Information Service, www.ildis.org, 2013). Son hierbas o arbustos perennes o anuales. Sus hojas son estipuladas con 3 foliolos. Tienen inflorescencias axilares y su fruto generalmente es una vaina indehiscente enrollada en espiral en sentido horario, la cual contiene una o varias semillas (Flora Ibérica, volumen 7) (figura 13).

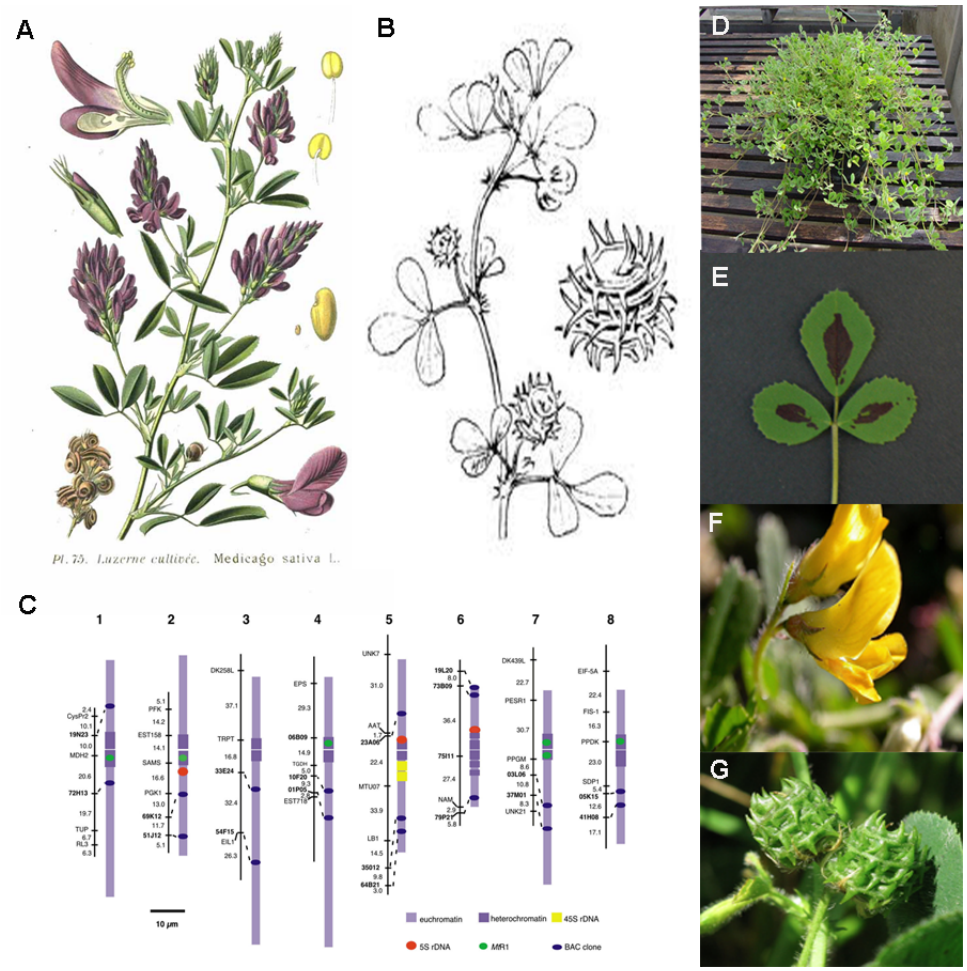


Figura 13. Género *Medicago*. Esquemas de *Medicago sativa* (A) y *Medicago truncatula* (B), plantas utilizadas en este estudio. Genoma de *Medicago truncatula*, totalmente secuenciado, consta de 8 cromosomas (C). Planta de *M. truncatula* en condiciones de invernadero (D). Detalle de hoja (E), flor (F) y vaina (G) de *M. truncatula*.

Son consideradas plantas forrajeras por su contenido proteico. Se observa nodulación en el 52% de las especies conocidas de este género. Forman nódulos indeterminados generalmente con rizobios de crecimiento rápido, como el género *Ensifer*, con distintos niveles de especificidad y efectividad según géneros (Sprent, 2009).

Dentro de este género, la especie *Medicago truncatula*, descrita por Gaertn en 1791, se caracteriza por presentar un punto negro en el centro de cada foliolo. Sus flores son de color amarillo y sus vainas son típicamente en espiral y con espículas, lo que la hace de difícil manipulación pero es una estrategia muy efectiva para su dispersión.

Es la especie de leguminosa más ampliamente estudiada, siendo considerada leguminosa modelo (Cook, 1999). Se propaga fácilmente y es relativamente fácil de transformar (Chabaud *et al.*, 2003, Crane *et al.*, 2006). Su genoma está secuenciado (Young *et al.*, 2011), tiene aproximadamente 550

Mpb y es diploide (figura 13). Se han desarrollado técnicas y herramientas, como el Medicago Gene Expression Atlas (Benedito *et al.*, 2008), que la convierten en objeto de estudio en muchos campos, especialmente en simbiosis. Se utilizan dos líneas de referencia R-108 y A17, con las que se han realizado la mayor parte de los estudios y de los mutantes caracterizados hasta el momento.

En el año 2008, Terpolilli y colaboradores determinaron que el mejor endosimbionte para esta leguminosa era *Ensifer medicae* WSM419, aunque también puede establecer simbiosis con *Ensifer meliloti* 1021; ésta es mucho menos efectiva que en el caso anterior. Sin embargo, esto conlleva una ventaja en estudios simbióticos, ya que *E. meliloti* 1021 es también organismo modelo, estando su genoma secuenciado y siendo una cepa de más fácil manejo, debido a que tiene afectada la formación de exopolisacárido (Glazebrook and Walker, 1989).

6. Interacción molecular Rhizobia-leguminosa

Muchas adaptaciones por parte del microorganismo y la planta hospedadora son requeridas para el establecimiento de una relación simbiótica y para una eficiente fijación de Nitrógeno.

La simbiosis *rhizobia*-leguminosa tiene como resultado final observable la formación de unas estructuras especializadas denominadas nódulos. Estos nódulos proveen un ambiente adecuado para la fijación de Nitrógeno. En general, es necesario una infección bacteriana y una organogénesis nodular para que al final de este proceso pueda darse la fijación de Nitrógeno (Oldroyd *et al.*, 2011).

Estos procesos, aunque diferentes, deben ir de la mano, coordinados para asegurar que donde haya una infección, haya un desarrollo del nódulo. Además, durante la invasión y la duración de la simbiosis, el rizobio debe ser capaz de evitar la respuesta inmune de la planta. El establecimiento de la simbiosis y todas las etapas de desarrollo dependen en su gran mayoría del tipo de hospedador.

Las plantas actinorrízicas del clado Fagales y algunas leguminosas (por ejemplo, *Chamaecrista*) confinan a sus microsimbiontes en unas estructuras tubulares sin llegar a ser canales de infección, que están rodeadas de pared celular y que en ellas tiene lugar la fijación de Nitrógeno en estas plantas. Este sistema intercelular en las plantas actinorrizas constituiría la forma ancestral de simbiosis fijadora de Nitrógeno (Sprent, 2007), en contraposición a las típicas estructuras denominadas simbiosomas, donde las bacterias se diferencian y especializan en su acción fijadora en la mayor parte de las leguminosas de las familias Mimosaceae y Fabaceae. Estudios más recientes proponen que el origen de la simbiosis fijadora de Nitrógeno puede estar en

plantas actinorrízicas del clado Rosales y Cucurbitales, que en un principio no formarían simbiosis pero poseen todo el "kit" de genes necesarios en señalización (Doyle, 2011; Svistoonoff *et al.,* 2014).

La formación del simbiosoma requiere una estricta compatibilidad genómica entre simbionte y hospedador, por ello parece más simple estudiar el sistema actinorrízico ya que la fijación ocurre en estructuras menos especializadas. Sin embargo este sistema presenta otras muchas dificultades, por lo que su estudio se ha retrasado. Por ello, se propone el uso de bacterias que pueden ser compatibles con un amplio rango de hospedadores, como por ejemplo *E. fredii* NGR234 y *E. fredii* USDA237 (Pueppke y Broughton, 1999). Además, existen algunas bacterias que también pueden infectar de forma intra (dependiente de factores de nodulación) o intercelularmente (independiente de factores de nodulación) para conseguir una simbiosis efectiva como las pertenecientes al género *Bradyrhizobium*, que pueden utilizar ambas vías según el hospedador (Masson-Boivin *et al*., 2009).

Existe un amplio rango de interacciones simbióticas efectivas por lo que se pueden clasificar estas interacciones en cuatro tipos:

Tipo 1: Sin interacción simbiótica, no hay infección del hospedador.

Tipo 2: Relación de parasitismo, en la que se forman estructuras semejantes a un nódulo pero no hay fijación de Nitrógeno.

Tipo 3: Una simbiosis parcialmente efectiva, entre un 20 y un 75 por ciento de la fijación respecto a un control con Nitrógeno.

Tipo 4: Una simbiosis totalmente efectiva, en la que la biomasa y la acumulación de Nitrógeno es superior a un 75% en relación a un control con Nitrógeno.

Según esta clasificación, la simbiosis *Rhizobia* leguminosa está dentro de lo establecido en el tipo 4 de estas interacciones, pudiéndose calificar como una rizoendosimbiosis mutualista estricta. Estos rizobios, por sí solos no disponen de mecanismos para crear un ambiente anaerobio, sino que requieren una posterior diferenciación en bacteroides rodeados de una membrana específica en el interior del nódulo para comenzar a fijar Nitrógeno.

En los apartados siguientes se describen las etapas que tienen lugar en el establecimiento de una asociación simbiótica fijadora de Nitrógeno típica (figura 14), como es la simbiosis *Rhizobia* leguminosa, desde el reconocimiento y diálogo molecular entre bacteria y hospedador hasta el proceso de fijación de Nitrógeno llevado a cabo intracelularmente por las bacterias, ya diferenciadas en bacteroides, que están dentro del orgánulo denominado simbiosoma.

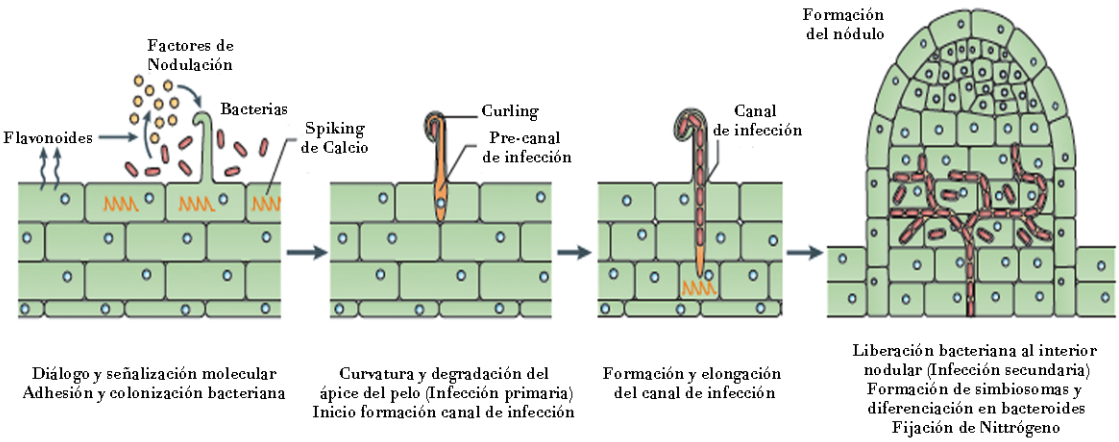


Figura 14. Representación esquemática de las etapas de una interacción simbiótica *Rhizobia* leguminosa (modificado de Oldroyd *et al*., 2011).

6. 1 Diálogo y señalización molecular

Previamente a la toma de contacto entre la leguminosa y el rizobio, ambos organismos establecen un complejo diálogo molecular que da lugar a su reconocimiento mutuo. Este intercambio de señales permite a la bacteria iniciar cambios en el desarrollo de la leguminosa que lleven a la formación de nódulos efectivos. El rizobio es capaz de reconocer los compuestos químicos que exudan las raíces de las plantas a la rizosfera (Downie, 2010).

Las leguminosas producen flavonoides, derivados de 2-fenil-1,4-benzopiranonas, que son las primeras señales en el intercambio que realizan bacteria-planta (Perret *et al*., 2000). La composición de estos flavonoides va a variar dependiendo de la especie de leguminosa y desencadenan una serie de respuestas específicas en los rizobios circundantes provocando la quimiotaxis activa de los rizobios hacia la superficie radical (Sánchez *et al*., 1991). Estos mismos flavonoides inducen la transcripción de los genes responsables de la nodulación, a través de un regulador transcripcional de la familia LysR, denominado NodD, que activa los genes *nod* que a su vez codifican para una serie de enzimas que forman los Factores de Nodulación (NF).

En *E. meliloti* hay tres copias de NodD. Dos de ellas, NodD1 y NodD2 son activadas por flavonoides, mientras que NodD3 es activada por el regulador simbiótico SymR, homólogo de NodD, que también induce la síntesis de exopolisacárido (EPS), independientemente de la presencia de flavonoides (Swanson et al., 1993).

Los NF están compuestos por una cadena de N acetil D glucosamina, unida por enlaces β 1,4 (sintetizados por *nodA*, *nodB* y *nodC*, que forman el operón *nodABC*). Presentan una serie de modificaciones dependiendo de la

cepa de *rhizobia*, que confieren cierta especificidad al proceso de nodulación (Spaink, 2000) (figura 15).

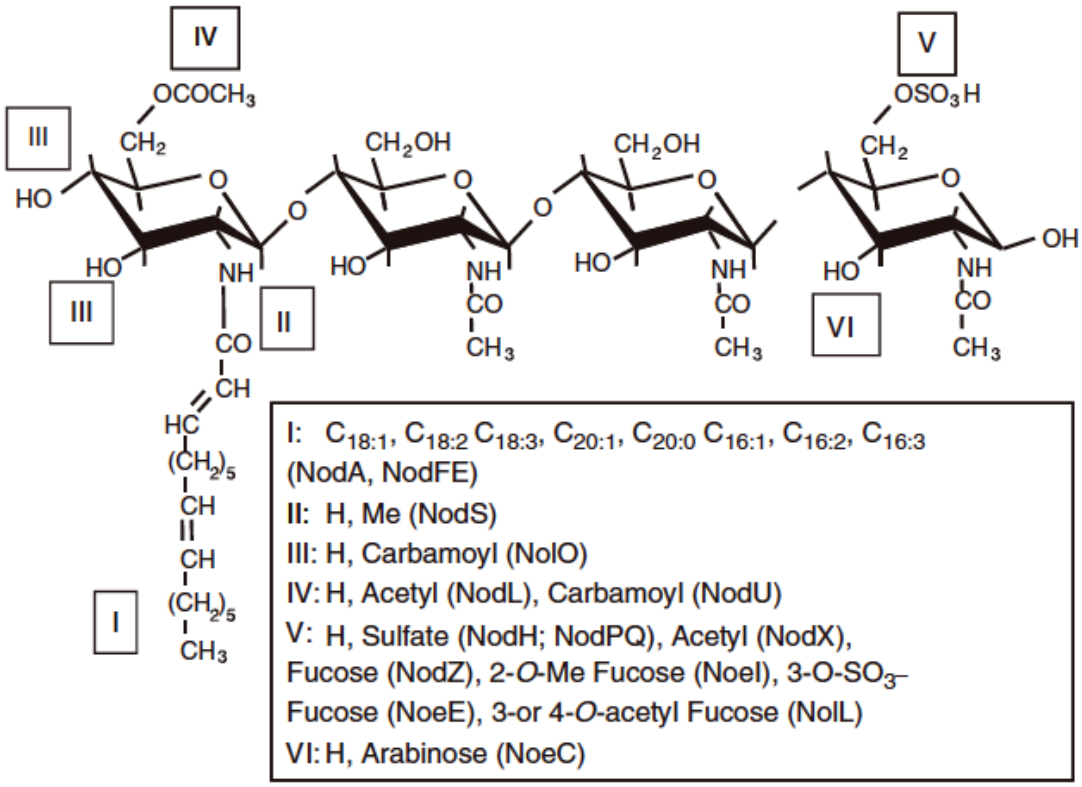


Figura 15. Diversidad de Factores de Nodulación. Los NF normalmente contienen cuatro o cinco residuos de ß(1-4)N-acetilglucosamina. Las diferentes sustituciones en este esqueleto generados por diferentes rizobios y los genes de nodulación que codifican para ellas están indicados en el recuadro (adaptado de Downie, 2010).

Algunos de los primeros estudios que recogían la estructura del factor de nodulación, conocidos por aquel entonces como CLOS (*chitolipooligosaccharides*), se publicaron en 1996 y hacían referencia a los factores de nodulación de *R. leguminosarum* bv trifolii. Ya entonces, se comprobó que existía gran diversidad en la composición y estructura del grupo acilo del factor de nodulación, incluso dentro de la misma cepa (Orgambide *et al.*, 1996). Más recientemente, se ha descrito que algunas especies de rizobios pueden sintetizar más de un tipo de NF, pero aun no es posible predecir el rango de hospedador según la estructura del NF que produzcan las bacterias (Jones *et al.*, 2007).

La señal de los NF es recogida por las células epidérmicas de las plantas, que contienen los siguientes receptores de NF: Nod Factor Receptor 1/LysM Receptor-like Kinase 3 (NFR1//LYK3) y NFR5/Nod Factor Perception

(NFP). Estos receptores en contacto con los NF son los iniciadores de la infección. La acción de los NF origina un incremento (3 veces) en la diferenciación de las células epidérmicas de la raíz en pelos radicales, una disrupción localizada de la cristalinidad en la arquitectura de la pared celular y la inducción de nuevos sitios de infección (Dazzo *et al*., 1996). A su misma vez, las células corticales situadas en las cercanías de los sitios de infección comienzan a dividirse, iniciándose la formación del nódulo (Limpens *et al*., 2003; Arrighi *et al*., 2008; Radutoiu *et al*., 2003; Madsen *et al*., 2003).

No obstante, la adicción de NF compatibles purificados a las raíces de las plantas no es por sí solo suficiente para causar la formación de los curlings, la formación de los canales de infección y de los nódulos maduros. Esto indica que los NF no son los únicos efectores bacterianos que se requieren para que el simbionte entre y colonize los tejidos y células vegetales (Dazzo *et al*., 1996; Gage, 2004; Jones *et al*., 2007; Gibson *et al*., 2008).

Tras la percepción de los factores de nodulación, la raíz está preparada para la infección. Después de la exposición de los pelos al NF, se producen reorganizaciones en filamentos de actina en los 3-5 primeros minutos (Weerasinghe *et al*., 2003), oscilaciones nucleares en los niveles de calcio ("Calcium spiking") en los siguientes 15 minutos (Ehrhardt *et al.,* 1996; Sieberer *et al.,* 2009) y las primeras deformaciones de pelos radicales suceden entre 1 y 3 horas después de todo esto (Heidstra *et al*., 1994; Sieberer *et al.,* 2009). Entre 16 y 18 horas después, en las células del pericíclo, y entre 18 a 24 horas después, en las células del córtex, los microtúbulos sufrirán una reorganización, activándose la movilidad nuclear (Timmers *et al.,* 1999). Todo ello está sincronizado con la formación y el desarrollo del canal de infección y la diferenciación del primordio nodular.

Con la percepción de los NF se desencadena una ruta de señalización que comparte características con las rutas de señalización de micorrizas arbusculares (Stracke *et al*., 2002; Murray *et al*., 2011). La unión del NF a los receptores activa: (i) CCamK/DMI3 (*Calcium-calmoduline Kinase*), que desencadena oscilaciones de calcio en los pelos radicales en crecimiento y que también es necesaria para la activación de la división de células corticales (Mitra *et al.,* 2004; Levy *et al*., 2004); (ii) DMI1 (*Doesn´t Make Infections*), que codifica para un canal de flujo de iones; (iii) DMI2, que codifica para un receptor necesario para la manutención del curling; y (iv) 2 reguladores GRAS (NSP1 y NSP2) que son requeridos para la activación de los cambios transcripcionales inducidos por NF (Ane *et al*., 2004; Riely *et al*., 2007; Esseling *et al.,* 2004; Kalo *et al*., 2005; Smit *et al.,* 2005) (figura 16).

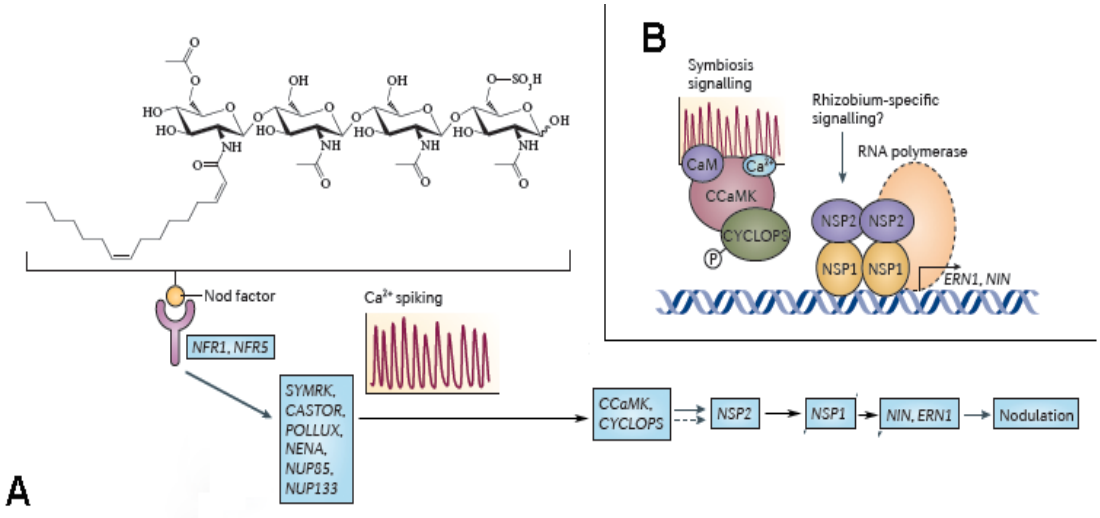


Figura 16. A) Estructura del NF predominante de *E. meliloti*, simbionte de *Medicago truncatula*, que unido al receptor desencadena la ruta simbiótica común en leguminosas del tipo *Lotus japonicus* y *M. truncatula*. B) Señalización molecular posterior a las oscilaciones de calcio (adaptado de Oldroyd, 2013).

CCaMK forma un heterodímero con CYCLOPS, al que fosforila. NSP1 y NSP2 forman un heterodímero en la membrana plasmática de la planta y son necesarios para la expresión de genes específicos de *Rhizobium.* Además están asociados con los promotores de genes (de la planta) inducidos por *Rhizobium*, NIN ("*nodule inception*") y ERN1. Los complejos CCaMK-CYCLOPS y NSP1-NSP2 son esenciales para la expresión de genes de la planta, que se encuentran *downstream* en la ruta, asociados a la nodulación (Oldroyd, 2013).

6. 2 Adhesión y colonización bacteriana

Los rizobios que están en la rizosfera son capaces de detectar los flavonoides y otros exudados de las raíces de las leguminosas, que actúan como quimiotácticos, atrayendo a los rizobios para iniciar el proceso de adhesión y colonización de la raíz (Miller *et al*., 2007).

Una variedad de moléculas bacterianas, como las ricadhesinas, las proteínas flagelares y las lectinas (Dazzo *et al.,* 1984; Hollingsworth *et al*., 1988; Ausmees *et al*., 1999; De Hoff *et al*., 2009; Fujishige *et al.,* 2006) han sido propuestas como factores importantes en la adhesión reversible, mientras que los polisacáridos bacterianos son los principales componentes e importantes para la adhesión irreversible. Las ricadhesinas, proteínas bacterianas de unión a calcio, median la unión polar entre células individuales (Smit *et al*., 1989; Gage, 2004). Las lectinas de la planta son las responsables de la unión con la superficie bacteriana (Gage, 2004; Downie *et al*., 2010). Entre los polisacáridos importantes en la unión irreversible se incluyen exopolisacáridos, lipopolisacáridos, ß(1-2)glucanos cíclicos (Davey y O´Toole, 2000) y las

microfibrillas de celulosa, que median la firme adhesión de la bacteria a los pelos radicales (formación de "caps") y la mantienen en la superficie radicular (Dazzo *et al*., 1984; Smit *et al.,* 1992; Mateos *et al*., 1995).

Se han descrito mutantes que carecen de EPS que ni invaden ni forman canales de infección originando nódulos vacíos y en algunos casos, alteraciones en la especificidad del hospedador (Dazzo *et al.*, 1991; Rolfe *et al,* 1996; Williams *et al*., 2008).

La implicación de celulosa en la adhesión secundaria (firme) ha sido descrita en muchas especies bacterianas, como *Gluconacetobacter xylinum, Escherichia coli, A. tumefaciens o R. leguminosarum* (Wong *et al*., 1990; Ross *et al*., 1991; Mateos *et al*., 1995). Los oligosacáridos que derivan de la biosíntesis del exopolisacárido rizobiano son esenciales en la infección, siendo señales para la iniciación de la formación del canal de infección, posiblemente actuando vía respuestas de defensa (Jones *et al*., 2008).

Sin embargo, la celulosa no parece ser esencial para la infección, debido a que mutantes defectivos en los genes *celA* y *celB* (implicados en biosíntesis de celulosa bacteriana) son capaces de establecer simbiosis efectivas (Ausmees *et al*., 1999; Laus *et al*., 2005; Williams *et al*., 2008). Aún así la celulosa es esencial en la colonización y formación de biofilms en la superficie bacteriana, puesto que estudios con mutantes superproductores de enzimas celulolíticas mostraron que los biofilms desarrollados no tenían la típica estructura tridimensional (Robledo *et al*., 2012). Además, se ha descrito que las microfibrillas de celulosa desaparecen tras la adición de celulasas comerciales, como por ejemplo la derivada de *Trichoderma* (Mateos *et al.*, 1995; Robledo *et al*., 2012).

6. 3 Modos de infección.

Para que se produzca una interacción simbiótica exitosa, el rizobio debe penetrar en su hospedador. La entrada del rizobio al interior de la planta puede producirse de distintas formas: canales de infección a través de los pelos radiculares, por cracks o heridas directamente en la pared celular o penetrando por los espacios intercelulares (Boogerd y van Rossum, 1997; Madsen *et al.,* 2010; Capoen *et al*., 2010; Mateos *et al*., 2011) (figura 17). Se da el caso de que algunas bacterias pueden usar varias de estas rutas según el hospedador (Capoen *et al.,* 2010).

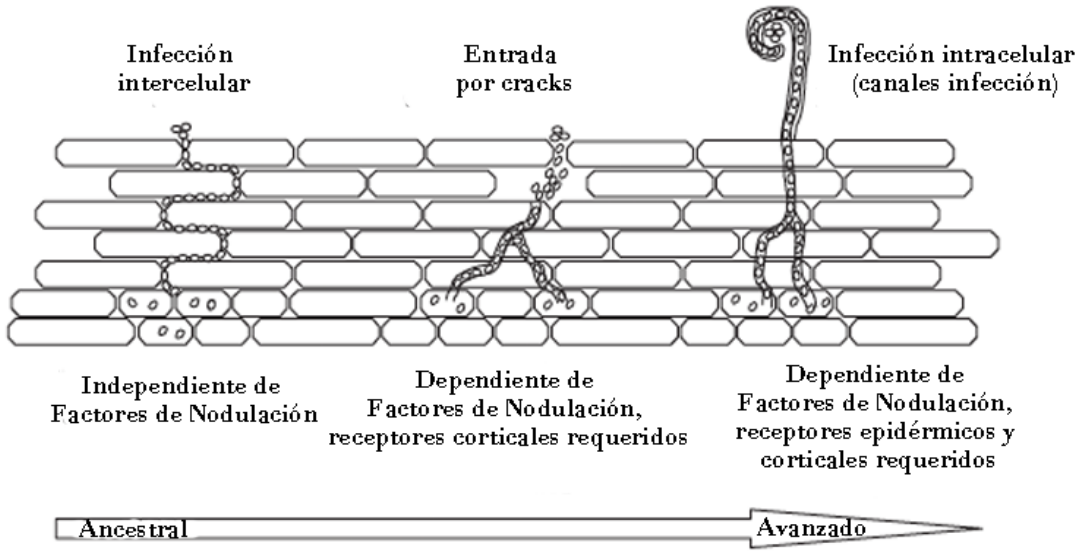


Figura 17. Modelos de infección en leguminosas. De izquierda a derecha, infección intercelular (se cree que es la más antigua evolutivamente hablando), infección por "cracks" o heridas e infección canónica o por pelos radicales. Estas dos últimas son dependientes de Factores de Nodulación (adaptado de Madsen *et al*., 2010).

El proceso de infección canónica o vía pelos radicales es el más frecuente en la mayoría de las leguminosas. Una vez los rizobios se encuentran en el interior del pelo, progresarán por los canales de infección que les conducirán al interior del nódulo, donde desarrollarán su función fijadora de Nitrógeno.

6. 3. 1 Curvatura y degradación del ápice del pelo radical (Infección primaria)

La adhesión va seguida de la primera evidencia microscópica de la percepción de la bacteria por la planta, que es el fenotipo Hac o "*Hair curling*". Los cambios fisiológicos descritos anteriormente estimulan el crecimiento del extremo apical del pelo radicular, produciéndose una deformación o curling, hasta la completa curvatura del pelo, denominada cayado de pastor o "*Shepherd Crook*" (Shaw et al., 2000). Los NF rizobianos inducen una altamente localizada respuesta que modula la diferenciación, extensión y la estructura cristalina de la pared celular de los pelos radicales (Dazzo *et al.*, 1996).

También se han descrito otras proteínas de membrana vegetales que son fundamentales en la infección, como las flotilinas (FLOT2 y FLOT4) y remorinas (como la descrita en *M. truncatula* SYMREM1) (Haney *et al*., 2010; Lefebvre *et al*., 2010), que actúan como proteínas de adhesión y controlan la infección.

Los cambios fisiológicos que experimentan los pelos radicales no son homogéneos en toda la raíz, pudiéndose establecer tres zonas diferenciadas. Los pelos más susceptibles crecen activamente en las zonas I y II, sin embargo, los pelos que han dejado de crecer no son susceptibles encontrándose en la zona III (Gage, 2004) (figura 18).

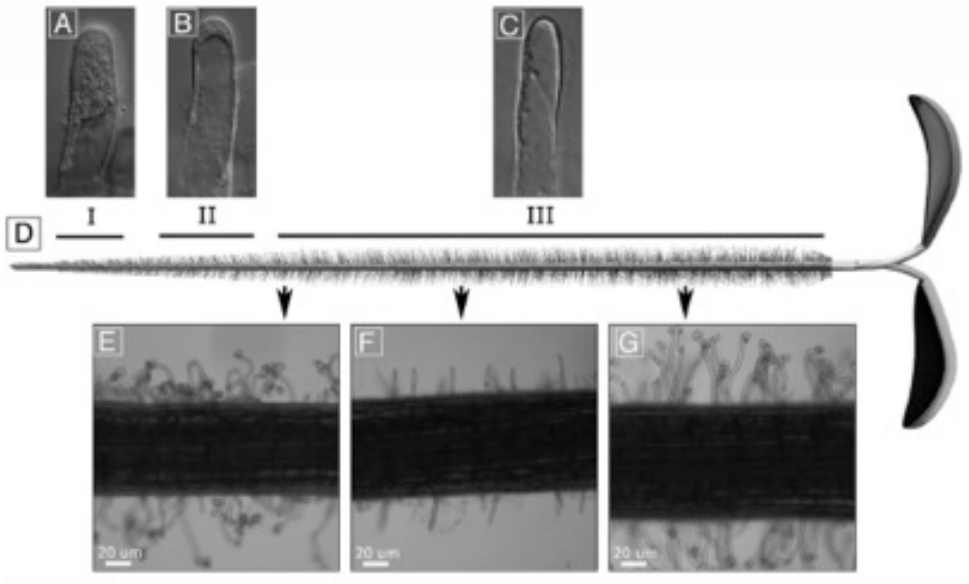


Figura 18. Estructura típica de una raíz. Morfología de los pelos radicales de las zonas I, II y III, antes de la inoculación (A-C, respectivamente). Diagrama de una plántula de *Medicago sativa* (D). Morfología de los pelos radicales post-inoculación según las zonas (E-G) (adaptado de Gage, 2004).

La susceptibilidad de los pelos radicales a la deformación en presencia de NF puede ser modulada por hormonas vegetales como el etileno, que inhibe la transducción de la señal de los NF e influye en la cantidad de deformaciones e infecciones producidas en los pelos (Oldroyd *et al.*, 2001).

Una vez formado el cayado de pastor, los rizobios quedan atrapados en una pequeña cavidad correspondiente al lugar donde estaban adheridos y comienza la formación del canal de infección. Esta etapa es crítica en la infección y debe estar muy regulada, puesto que, si la célula resulta alterada mediante cualquier mecanismo, ya sea mecánico, enzimático o de otra índole, dicha célula puede perder su integridad y el proceso de infección abortará.

Las bacterias atrapadas en la curvatura del pelo radical penetran en éste debido a la degradación localizada de su extremo apical por la acción hidrolítica de poligalacturonasas, pectinasas, celulasas y hemicelulasas bacterianas (Muñoz *et al*., 1998; Oldroyd y Downie, 2008; Oldroyd *et al.* 2011; Robledo *et al.* 2008; Robledo *et al*., 2011).

6. 3. 2 Formación y elongación del canal de infección.

Después del reconocimiento del rizobio y su adhesión a los pelos, éstos son encerrados en un espacio apoplástico creado por la deformación o curling del pelo. Esta infección transcelular apoplástica a través del pelo radicular tiene lugar mediante la progresiva formación de un compartimento tubular creado por el hospedador, conocido como canal de infección (Brewin, 2004; Gage, 2004).

Los canales de infección son estructuras tubulares por las que discurren y se dividen las bacterias en su camino al interior del nódulo en formación. En su interior está contenida una matriz, de la cual no se conoce en detalle su composición. La estructura de la pared celular del canal de infección es similar a la pared celular exterior de pelo, por lo que el rizobio está aún fuera de la célula. Estas paredes del canal están formadas por pectinas, xiloglucanos y celulosa (Rae *et al*., 1992).

El ápice del canal de infección es un lugar en crecimiento donde se sintetiza nueva membrana y/o pared celular, exisitiendo una reorganización de la polaridad de la célula (Gage, 2004). El rizobio entra en el canal de infección y se divide. El canal atraviesa el pelo por completo y porsteriormente, las células subyacentes hasta alcanzar el córtex (Mateos *et al.,* 2011). El camino seguido por el canal de infección en el córtex es anticipado por la formación de puentes citoplasmáticos transcelulares conocidos como canales de preinfección (van Brussel *et al*., 1992; Timmers *et al.,* 1999; Murray, 2011).

Las citoquininas (hormonas vegetales) y la reiniciación del ciclo celular, dependiente de NF, son los responsables de dirigir el crecimiento de los canales de infección hacia el córtex (Jones *et al*., 2007). Algunos autores apuntan a una posible implicación de otros genes que codifican proteínas (VAPYRIN y PUB1) que actúan como conectores en el tráfico de vesículas para la elongación del canal (Murray, 2011). Cuando el canal de infección llega al primordio nodular, el rizobio es exocitado en la célula hospedadora envuelto en la membrana peribacteroidea originada por la planta. La consecuente diferenciación es necesaria para la formación de un nódulo fijador de Nitrógeno funcional (Mateos *et al*., 2011).

A medida que el canal de infección se va formando y va pasando de una célula a otra hasta alcanzar el primordio, es necesaria la degradación de las paredes vegetales para permitir su paso. Este proceso de hidrólisis no se conoce totalmente pero se propone que es causado por enzimas hidrolíticos de la planta (Vance, 1983), de la bacteria (Mateos *et al*., 1992; Mateos *et al.,* 2001; Robledo *et al*., 2008; Robledo *et al*., 2011) o por ambos (van Spronsen *et al.,* 1994).

6. 3. 3 Liberación en el interior del nódulo y formación de simbiosomas (Infección secundaria).

Una vez que el canal de infección llega al primordio nodular, las bacterias son liberadas al citoplasma de la célula vegetal (fenotipo Bar o bacterial release) rodeadas por la membrana peribacteriodea para finalmente diferenciarse en bacteroides y formar un orgánulo conocido como simbiosoma (Brewin, 1991) (figura 19).

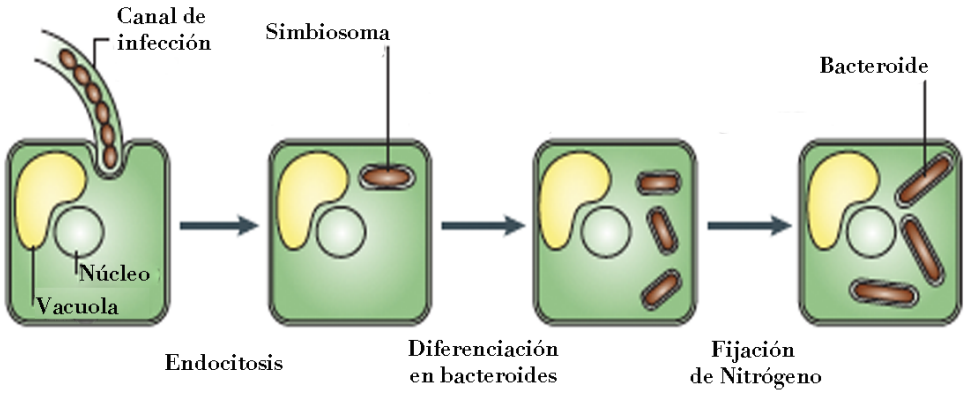


Figura 19. Representación esquemática de los eventos ocurridos en infección secundaria, desde la liberación de la bacteria al final del canal de infección a la fijación de Nitrógeno llevada a cabo en los simbiosomas (adaptado de Jones *et al.*, 2007).

Después de que el canal de infección ha llegado al primordio nodular, las células vegetales, aún no infectadas, se van reorganizando hasta dar lugar al meristemo nodular. Los canales de infección pueden formar una red muy ramificada que en su punto final se unirán y con lo cual, podrá aumentar el número de bacterias exocitadas en la zona de infección del nódulo (Vasse *et al.*, 1990) (ver apartado 6. 3. 2).

La formación de simbiosomas representa un punto importantísimo en la evolución de la simbiosis nodular. En leguminosas primitivas como las pertenecientes a la subfamilia Caesalpinoideae, los simbiosomas están rodeados de pared celular (Fonseca *et al.*, 2012). Tampoco se forman simbiosomas canónicos (normales) en la única no leguminosa descrita hasta el momento que puede formar nódulos primitivos, *Parasponia spp.* En estas especies, la única diferencia consiste en que los rizobios no se liberan al final del canal de infección, sino que fijan Nitrógeno dentro de los canales, denominados canales de fijación (Limpens *et al.*, 2005; Op den Camp *et al.*, 2011).

6. 3. 4 Diferenciación en bacteroides y Fijación de Nitrógeno.

La diferenciación de los bacteroides implica la inducción del sistema enzimático fijador de Nitrógeno de la nitrogenasa, que llevará a cabo la reducción del Nitrógeno atmosférico a amonio, para poder ser asimilado por la planta. Los rizobios en este punto experimentan cambios morfológicos, así por ejemplo, *E. meliloti* aumenta de 5 a 7 veces su tamaño y *R. leguminosarum* adquiere forma de Y.

Recientemente se ha visto que en la diferenciación a bacteroides fijadores es requerida una secreción de péptidos ricos en cisteína (NCR "*nodule-specific cysteine-rich peptides*") por parte de la planta, que se introducen en el citosol de la bacteria (van de Velde *et al*., 2010; Wang *et al.,* 2010). Los NCR de la planta y la proteína BacA del rizobio son esenciales en la diferenciación del bacteroide. Se ha descrito que BacA es indispensable para la protección del bacteroide en *E. meliloti* frente a algunos de estos NCR, que tienen actividad antimicrobiana (Haag *et al.,* 2011).

En el bacteroide se producen cambios que llevan al silenciamiento del metabolismo, aumentando la expresión de genes involucrados en fijación de Nitrógeno. Este cambio, se ve inducido por los reguladores transcripcionales *fix* (*fixJ* y *fixK*) que están inducidos por una deficiencia de Oxígeno dentro del bacteroide (Mesa *et al*., 2008). Entre los genes activados se encuentran los genes *nif*, que codifican para el complejo nitrogenasa, formado por una nitrogenasa y por una nitrógeno reductasa, necesarias para la fijación de Nitrógeno (Fischer, 1994). Además es necesaria la síntesis de leg-hemoglobina para secuestrar el Oxígeno y que no llegue al complejo nitrogenasa y así evitar que se inhiba. El amonio se asimila en forma de glutamina y es transportado a la planta.

El equilibrio en el intercambio de metabolitos entre la planta y el simbiosoma es crucial para el mantenimiento de la simbiosis. Una alteración podría acidificar el interior del bacteroide que induciría la activación de hidrolasas, muerte del simbiosoma y senescencia del nódulo (Gage, 2004).

6. 4 Desarrollo nodular.

El desarrollo de un nódulo comienza a la misma vez que se establece el diálogo molecular entre el microorganismo, es decir, la bacteria y su planta hospedadora. En este punto, se induce la expresión *in planta* de unos genes denominados nodulinas tempranas (ENODs "early nodulin genes"), que son requeridos para la diferenciación del primordio nodular (Hirsch *et al*., 1995).

6. 4. 1 Tipos de nódulos.

Dependiendo del lugar de inducción de las divisiones mitóticas en la raíz, podemos encontrar dos tipos de nódulos, nódulos determinados, como en *Phaseolus*, *Glycine* o *Lotus*, o indeterminados como en *Medicago* o *Trifolium*. Si se originan en el córtex interno se producen nódulos indeterminados y si lo hacen en el córtex externo, nódulos determinados (figura 20). Ambos tipos de nódulos, además de presentar una estructura anatómica distinta, también difieren en el comportamiento de la bacteria dentro del nódulo en formación. Sin embargo, la inducción del ciclo celular en ambos sistemas sigue la misma regulación.

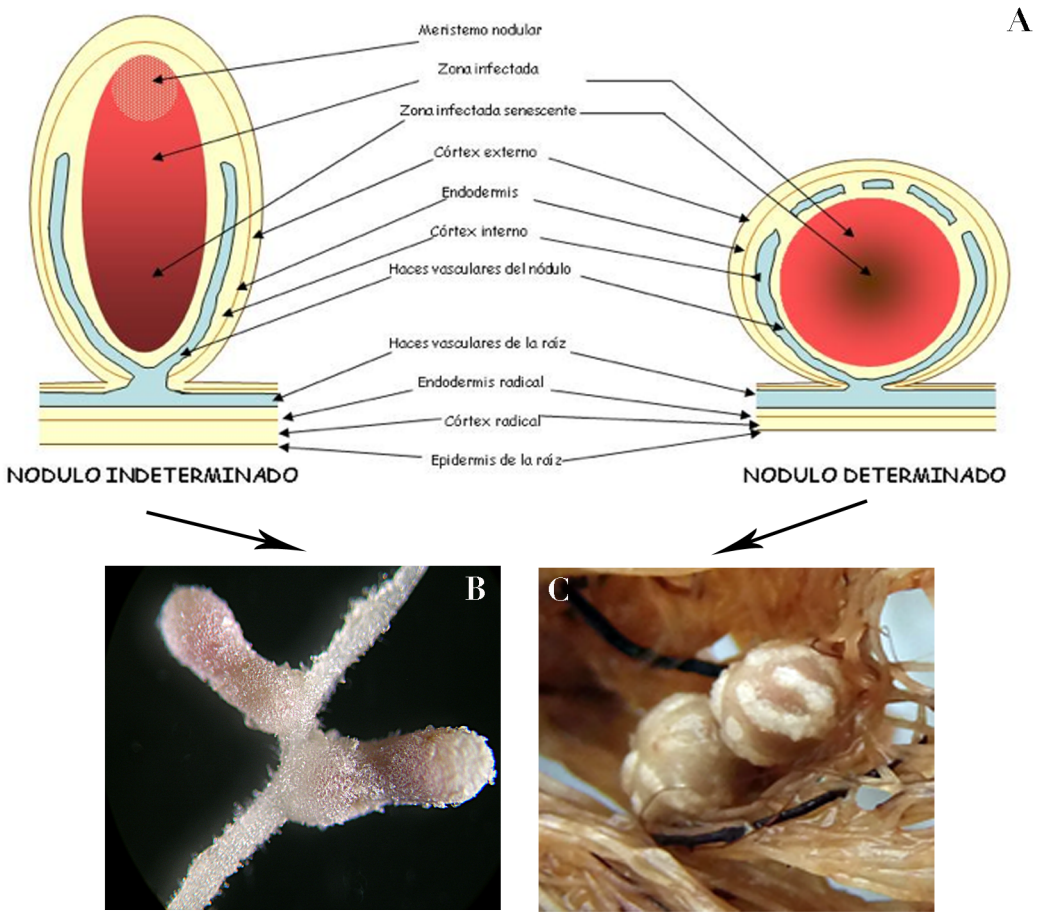


Figura 20. Tipos de nódulos. A) Esquema de los dos tipos de nódulos encontrados en las leguminosas (adaptado de Buchanan *et al.*, 2010). B) Nódulo indeterminado de *Medicago sativa.* C) Nódulo determinado de *Phaseolus vulgaris*.

6. 4. 2 Partes de un nódulo indeterminado.

Los nódulos indeterminados se dan en plantas como las del género *Medicago*, *Pisum*, *Trifolium* y *Vicia*. En los nódulos indeterminados, la disposición de las bacterias define una serie de regiones en su interior (Hirsch, 1999).

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) (figura 21).

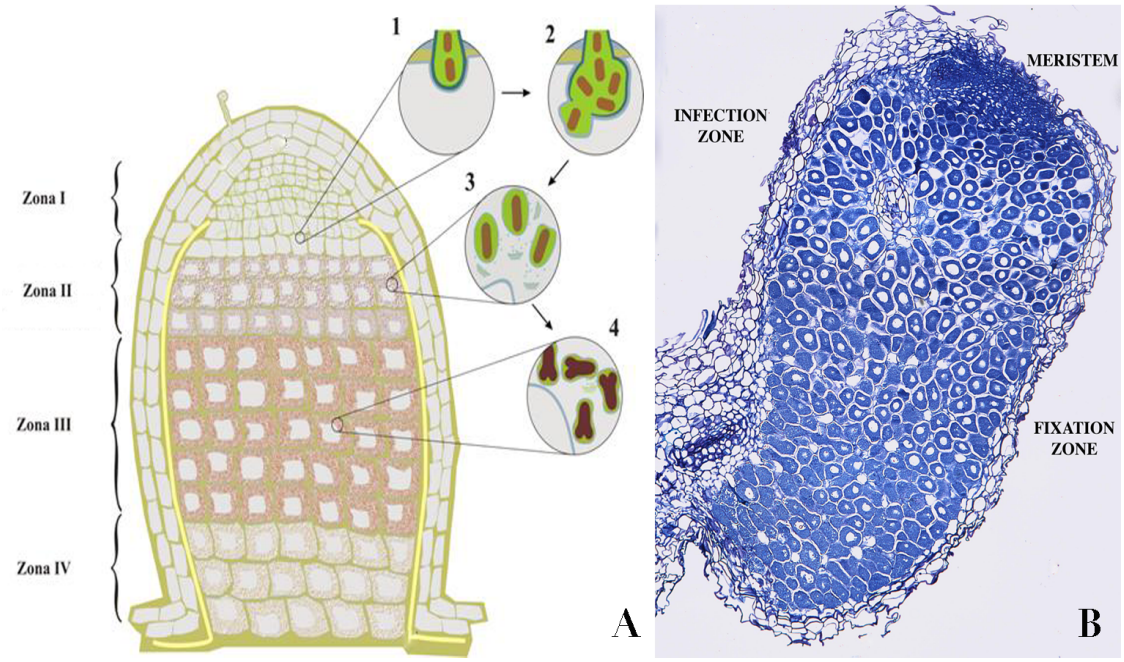


Figura 21. Estructura de un nódulo indeterminado típico fijador de Nitrógeno. A) Esquema de las zonas en las que se divide el nódulo y eventos producidos en las distintas zonas. En la zona II se produce la llegada del canal de infección (1) y la liberación de las bacterias al interior celular (2), donde comienza su diferenciación (3)

hasta que en la zona III, se forman los simbiosomas (4), donde se fijará el Nitrógeno (modificado de Scheres *et al.,* 1990). B) Corte histológico de un nódulo funcional de *Trifolium repens* en el que se diferencian a la perfección las zonas anteriormente descritas (adaptado de Mateos *et al*., 2011).

7. Especificidad y reacciones de defensa en el proceso simbiótico.

7. 1 Especificidad de hospedador.

La formación de una simbiosis efectiva es un proceso altamente específico, sin embargo, este grado de especificidad varía mucho entre los diferentes rizobios. Algunas cepas tienen un rango de hospedador muy reducido como por ejemplo *R. leguminosarum* biovar trifolii cuyo hospedador específico es *Trifolium*. *Ensifer meliloti* tiene un rango menos restrictivo ya que nodula *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*. Otras cepas tienen un amplio rango de hospedador como *Rhizobium sp*. NGR234 que nodula 112 géneros incluyendo la no-leguminosa *Parasponia*, o *E. fredii* USDA237, que nodula 79 géneros, también incluyendo *Parasponia* (Pueppke and Broughton, 1999).

En una simbiosis eficiente, tanto la planta como la bacteria sintetizan moléculas importantes que determinan la especificidad de hospedador. Los flavonides secretados por las raíces de las leguminosas actúan como determinantes de la especificidad de hospedador. La concentración de flavonoides se incrementa en presencia de los rizobios compatibles (Cooper *et al*., 2007). Hay unos 30 flavonoides descritos que inducen la expresión de genes *nod* en cultivo puro del rizobio compatible (Cooper *et al*., 2004). Estos genes, a excepción de *nodD,* no se expresan si no reciben la señal inductora de la planta. NodD reconoce los flavonoides específicos secretados por la planta. Una vez activada por los flavonoides, la proteína NodD a su vez activa la transcripción de los genes de nodulación.

Como se describe en el apartado 6. 1, los NF tienen un esqueleto común de N-acetil-glucosamina, unidas por enlaces ß(1, 4). Lo que determina la especificidad de hospedador es el tipo de sustituciones que contiene. Los genes *nodABCD* están envueltos en la síntesis del esqueleto lipooligosacarídico y son estrictamente requeridos en nodulación. Los genes específicos de hospedador, *nodL* o *nodH*, son los que confieren la/s sustitución/es adecuadas (Debelle *et al*., 2001). Mutantes dobles *nodF-nodL* de *E. meliloti* son capaces de inducir deformaciones y estimular la división de células corticales en *Medicago sativa*, pero no se origina cayado de pastor y los canales de infección abortan antes de llegar a la base de la célula del pelo radicular (Ardoureel *et al*., 1994).

Las mutaciones en estos genes pueden resultar en el cambio del rango de hospedador del rizobio, por lo que los NF juegan un papel crucial en la

determinación de hospedador.

Existen otras moléculas rizobianas implicadas en la especificidad de hospedador. Las ricadhesinas (Smit *et al*., 1987), las lectinas vegetales (Dazzo *et al*., 1984; De Hoff *et al.,* 2009) y, posiblemente, las microfibrillas de celulosa y las enzimas hidrolíticas rizobianas (celulasas), constituyen moléculas que participan de uno u otro modo en la adhesión al pelo radical del hospedador específico.

Además, la importancia de los polisacáridos bacterianos en el establecimiento de la interacción simbiótica y el posterior desarrollo del proceso infectivo es crítica ya que, además de su implicación en la competitividad de las cepas, se ha demostrado que mutantes defectivos en la síntesis de los mismos presentan escasa infectividad, baja capacidad para nodular y, en algunos casos, alteraciones en el rango de hospedador (Rolfe *et al*., 1996; Fraysse *et al.,* 2003; Williams *et al*., 2008).

Los exopolisacáridos rizobianos (EPS) son polímeros heretopolisacarídicos específicos de especie que se componen de un esqueleto oligosacarídico con sustituciones diferentes a los carbohidratos. La síntesis, modificación, polimerización y la exportación al exterior celular de los EPS está regulada por los genes exo/exs, localizados en megaplásmidos simbióticos o en el cromosoma. La producción de EPS está influenciada por factores ambientales (Skorupska *et al*., 2006). Además de estar envueltos en el establecimiento de la simbiosis rhizobia-leguminosa, hay numerosas evidencias de que juegan un papel importante en la proteción contra las defensas del hospedador (D 'Haeze and Holsters 2004). *E. meliloti* 1021 requiere succinoglucano (EPS) para el establecimiento de una simbiosis funcional en *Medicago sativa* y *Medicago truncatula*, es decir, en su ausencia no se inicia el desarrollo del canal de infección y, aunque se forma el nódulo, éste se encuentra vacío (Pellock *et al*., 2000; Leigh *et al*., 1985).

7. 2 Reacciones de defensa durante la infección rizobiana.

Las plantas pueden inducir respuestas de defensa inmune contra los microorganismos en respuesta a la percepción de diversos factores microbianos (MAMP, "*microbial-associated molecular patterns*"). Esta percepción desencadena una cascada de señalización y la producción de antimicrobianos (Ausubel, 2005).

En la interacción beneficiosa *rhizobia*-leguminosa no se elicitan respuestas de defensa en la planta, aunque en algunos estadíos de la infección sí que pueden producirse determinadas respuestas defensivas (Mithoefer, 2002). Los elicitores más comunes son flagelinas, proteínas de choque térmico (CSP), quitina y LPS. Las plantas responden a estos elicitores con respuestas de defensa basales que incluyen incremento en el pH extracelular, producción

de etileno, especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (NOS), deposición de compuestos fenólicos y cambios en el calcio intracelular (induce cambios transcripcionales en las cascadas de señalización) (Jones *et al*., 2007).

Además de ser moléculas clave en el establecimiento de la simbiosis, los polisacáridos de superficie, exopolisacáridos (EPS), polisacáridos capsulares (KPS) y lipopolisacáridos (LPS) previenen contra las respuestas de defensa elicitadas por la invasión, contribuyendo, por ejemplo, a la protección contra ROS (Santos *et al*., 2001; Jones *et al*., 2007).

Algunos estudios de genómica comparativa sostienen que los genes *exo* y *exp*, responsables de la síntesis de EPS no están presentes en todos los rizobios beneficiosos, pero sí están presentes en patógenos como *Agrobacterium tumefaciens* (recientemente reclasificado en el género *Rhizobium*, ver tablas 1, 2 y 3). Además, no todos los EPS son sintetizados iguales o de la misma manera; por ejemplo, el EPS de *R. leguminosarum* no se sintetiza igual que el EPS de *E. meliloti*, por lo que existen hipótesis en las que se propone su rol y el de los KPS en una defensa pasiva de la planta (Masson-Boivin *et al*., 2009).

La ausencia de LPS, EPS y de ß-glucanos cíclicos son la causa de la aparición de nódulos inefectivos. Los componentes del LPS de *E. meliloti*, como el lípido A, suprimen las respuestas de defensa de *M. truncatula* y *M. sativa* (Tellstrom *et al.,* 2007; Scheidle *et al*., 2005), aunque en plantas no hospedadoras sí inducen estrés oxidativo (Scheidle *et al.,* 2005).

Mutantes afectados en la síntesis de EPS en *E. meliloti* inducen en sus hospedadores correspondientes respuestas típicas de defensa frente a patógenos, como alteraciones de la pared celular vegetal (depósitos de callosa), acúmulo de polifenoles y producción de fitoalexinas (Niehaus *et al*., 1993).

Todos los estudios apuntan a que estos derivados polisacarídicos están implicados en señalización, actuando como supresores de las reacciones de defensa de la planta hospedadora, aunque probablemente sean específicos de cada interacción. Esto implicaría la existencia de receptores específicos en la planta implicados en el reconocimiento de dichas señales (Mithoefer, 2002).

Recientemente se ha descrito que la sobreexpresión de una celulasa rizobiana puede afectar a las defensas de la planta, incrementando de forma transitoria la producción de ROS en las etapas iniciales de infección en la simbiosis *Rhizobium-Trifolium* (Robledo *et al*., 2011). La implicación de estas moléculas en las respuestas de defensa así como su naturaleza serán discutidos y expuestos más adelante en este trabajo.

8. Enzimas degradativos de la pared celular vegetal implicadas en simbiosis

Los rizobios poseen enzimas hidrolíticos capaces de degradar los polisacáridos de las paredes celulares de sus plantas hospedadoras, característica compartida con muchos otros microorganismos, incluidos los patógenos.

Un evento crucial en el proceso de infección de una simbiosis Rhizobia-leguminosa eficiente es la entrada de la bacteria a través de la pared celular vegetal. Este proceso debe ser altamente regulado de manera que se mantenga la integridad de la célula, puesto que un desequilibrio en esta entrada de la bacteria puede resultar en plasmólisis y por consiguiente, el proceso abortaría.

8. 1 Celulasas bacterianas y pectinasas vegetales.

Varias hipótesis fueron propuestas para explicar cómo ocurría la entrada del rizobio a la planta. La primera de ellas proponía que el rizobio redirigía el crecimiento de la pared celular, produciéndose una invaginación que daría lugar al canal de infección, en lugar de una hidrólisis de la pared celular (Nutman, 1956). Otra hipótesis propone que las cepas de *Rhizobium* inducirían a su leguminosa homóloga a la produccion de poligalacturonasas (pectinasas) que debilitarían la pared celular en el sitio de infección y posibilitaría la entrada de la bacteria entre las microfibrillas de la pared celular hasta la membrana plasmática, desde la cual se originaría el canal de infección (Ljunggren and Fahraeus, 1961). La tercera hipótesis propone que enzimas hidrolíticas producen una erosión localizada de la pared celular, permitiendo la entrada directa de la bacteria (Hubbell, 1981).

Diversos estudios describieron la producción de pectinasas, celulasas y hemicelulasas por parte de los rizobios en cultivo puro (Hubbell *et al.*, 1978; Martinez-Molina *et al.*, 1979; Morales *et al.*, 1984). Los estudios con microscopía electrónica confirmaron la hipótesis en la que los enzimas hidrolíticos están implicados en el desarrollo de la infección. La evidencia más notable fué que en la simbiosis *R. leguminosarum* bv trifolii con *Trifolium repens* se producía una degradación localizada en la pared celular, coincidente con la deposición de una nueva capa de pared celular (Callaham and Torrey, 1981).

A partir de aquí se abren dos posibilidades, que los enzimas hidrolíticos de la pared vegetal estén asociados a la bacteria o que sean inducidos localmente en la planta. No se puede afirmar inequívocamente que uno sólo de ambos modelos sea correcto.

En cuanto al modelo vegetal, genes específicos que codifican para poligalacturonasas (PGs) se expresan en las células del primordio nodular y de la zona de invasión en nódulos de *M. sativa*, sugiriendo un rol de estas PGs en la reorganización de la pared celular y en la entrada y salida del rizobio en el canal de infección (Muñoz *et al*., 1998). Se ha descrito en raíces tranformadas de *M. truncatula* con la fusión MsPG3-GFP, que ésta se acumula en el ápice en

crecimiento del pelo radical, confirmando la presencia de PGs en la zona de síntesis de nueva pared celular (Rodriguez-Llorente *et al*., 2003).

Estudios más recientes revelan el papel que juegan las pectato liasas de *Lotus japonicus*, que son requeridas para la infección por su rizobio compatible *Mesorhizobium loti* (Xie *et al*., 2012). Mutantes defectivos en *LjNPL*, que codifica para dicha enzima, están afectados en la infección, aunque a veces sí que se forman canales de infección, por lo que otras proteínas, tanto de origen vegetal como bacteriano, pueden estar implicadas en este proceso.

Desde el punto de vista bacteriano, es mas aceptable la hipótesis que implica enzimas hidrolíticas producidas por la bacteria. Desde que se pusieron a punto métodos de gran sensibilidad para detectar actividades enzimáticas hidrolíticas de los polisacáridos que componen la pared celular vegetal (Mateos *et al*., 1992), se ha comprobado que todas las cepas tipo de *Rhizobium* poseen celulasas (Jimenez-Zurdo *et al.,* 1996; Robledo *et al*., 2008). Asimismo se ha descrito que *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii ANU843 produce al menos dos isoenzimas con actividad celulásica (CelC1 y CelC2) y uno con actividad pectinásica (P). Sin embargo, la actividad pectinásica sólo se detectó en *R. leguminosarum* biovar. trifolii y en *E. meliloti* (Jiménez-Zurdo *et al.*, 1996).

En estos estudios, también se ha comprobado que todos los genomas de los rizobia actualmente secuenciados presentan genes que codifican posibles celulasas pertenecientes a diferentes familias de glicosil hidrolasas que se encuentran localizados cerca de otros genes implicados en la biosíntesis de celulosa. Estos resultados son consecuentes con la hipótesis de una implicación de los enzimas celulolíticos producidos por *Rhizobium* en el proceso de infección de las leguminosas.

Utilizando microscopía de contraste de fases/luz polarizada y aproximaciones bioquímicas se encontró que únicamente la celulasa CelC2 producía un orificio localizado en la pared celular del ápice en crecimiento del pelo radical, compuesto de celulosa no cristalina (fenotipo Hot "Hole on the Tip") (Mateos *et al.,* 2001).

8. 2 Implicación de la celulasa CelC2 en la colonización, la infección primaria y la infección secundaria.

La celulasa rizobiana CelC2 es una 1,4-ß-D-endoglucanasa (EC 3.2.1.4) con una masa molecular de 33,2 KDa. Posee especificidad de sustrato para celulosa no cristalina, que coincide con la composición del ápice de los pelos radicales y en el final del canal de infección. Además, la celulasa CelC2 presenta un pH óptimo de 5,0; una temperatura óptima de 40ºC y una constante Km de 89,4 mg/ml en la hidrólisis del sustrato carboximetilcelulosa (Robledo *et al*., 2008).

En estudios con microscopía óptica se llevó a cabo la monitorización del

efecto de la celulasa CelC2 purificada sobre raíces axénicas de trébol, produciéndose una degradación de la pared celular en el ápice del pelo radical permitiendo la liberación de material citoplásmico (2 horas post-aplicación). Después de 8 horas se puede observar un agujero en el ápice del pelo radical, muy localizado, que coincide con el sitio por donde penetra la bacteria en la planta iniciando el proceso endosimbiótico fijador de Nitrógeno. Esto conlleva al establecimiento de un nuevo fenotipo implicado en el proceso de infección, llamado fenotipo Hot (Hole on the Tip), del que es responsable la celulasa CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ANU843 en el proceso de infección en trébol. El orificio producido por dicha celulasa mide entre dos y tres micrómetros de diámetro, que son suficientes para permitir la entrada del microorganismo en la planta (Mateos *et al*., 2001) (figura 22).

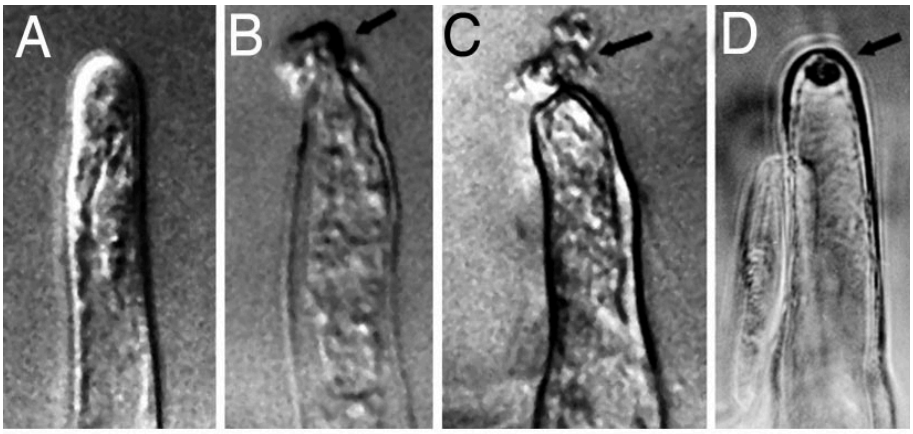


Figura 22. Actividad biológica de la celulasa CelC2 de *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843 purificada en pelos radicales de *Trifolium repens*. Las micrografías muestran: A) Pelo sin tramiento enzimático; B) Inicio de la formación del fenotipo HoT; C) Extrusión del protoplasto y liberación a través del orificio formado; D) Orificio final realizado por la celulasa CelC2 en el ápice del pelo por el cual se ha liberado el citoplasma. La integridad de la célula no se ve comprometida, ya que este orificio se realiza de forma muy regulada y localizada (adaptado de Robledo *et al*., 2008).

El gen *celC,* que codifica para dicha celulasa, está localizado cerca de genes que codifican para enzimas implicadas en la biosíntesis de celulosa bacteriana, localizados en el cromosoma, formando el operón *celABC.* Recientemente se ha descrito el papel de la celulosa y de las celulasas de *Rhizobium* en la colonización y formación de biofilms (Robledo *et al*., 2012). Este hecho indica la posibilidad de la existencia de estrategias de infección basadas en celulasas asociadas a celulosa sintasas para evitar la activación de las respuestas de defensa de las plantas.

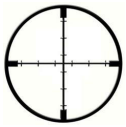
Mutantes knockout de la celulasa CelC2 en *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843 muestran un defecto en la erosión de la punta del pelo radicular y la no formación de canales de infección. El resultado final es la formación de

nódulos vacíos en su hospedador específico, el trébol blanco (Robledo *et al.*, 2008).

Además, la degradación de la punta del pelo radicular se ve favorecida por la presencia en el medio de factores de nodulación de trébol purificados, sugiriendo una posible interacción entre las celulasas producidas por la bacteria y los NF. Por otro lado, cuando se aplica exógenamente el mismo enzima a las raíces de alfalfa, hospedador habitual de *Ensifer meliloti* no se observa ningún efecto lo que sugiere una posible especificidad de hospedador (Mateos *et al.*, 2001). Si bien, esta cepa no contiene homólogos de la celulasa CelC2, sí contiene otros tipos de celulasas en su genoma. Además, otras cepas y/o especies del género *Ensifer* sí que contienen homólogos a dicha celulasa, aunque no en el cromosoma, sino en plásmidos; como ocurre en *E. medicae* WSM419.

Para ahondar más en la función de esta celulasa, se diseñaron mutantes superproductores de esta celulasa en la cepa ANU843. El aumento de producción de la celulasa CelC2 produce una desregulación en el equilibrio existente entre degradación y ensamblaje de la pared celular de los pelos radiculares de la raíz de la planta hospedadora durante las etapas de infección necesarias para el establecimiento de una simbiosis efectiva (Robledo *et al.*, 2011). Los nódulos de plantas de trébol blanco muestran estructuras aberrantes en el interior debido a la extensiva degradación de la celulosa no cristalina localizada en los puntos de liberación al final de los canales de infección.

Todos estos resultados prueban la importancia que tienen las celulasas rizobianas en el establecimiento de la simbiosis fijadora de Nitrógeno. La importancia de la celulasa CelC2 entre *R. leguminosarum* y el trébol blanco, su planta hospedadora, ha sido demostrada en trabajos recientes (Robledo *et al.*, 2008; Robledo *et al.*, 2011) pero poco es conocido sobre su acción y la acción de celulasas homólogas en otros sistemas simbióticos, como lo es la interacción simbiótica modelo *Ensifer – Medicago*.



OBJETIVOS

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado a lo largo de los años una sólida línea de estudio de las interacciones mutualistas *rhizobia*-leguminosa a nivel taxonómico, bioquímico y molecular. Se han publicado numerosos trabajos sobre la implicación de la celulasa rizobiana CelC2 en la relación simbiótica *Rhizobium – Trifolium*, en los cuales se le atribuyen dos roles. El primero de ellos está relacionado con la adhesión de la bacteria a la punta del pelo radical, jugando un papel importante en la síntesis de las microfibrillas de celulosa que se encuentran implicadas en la correcta formación de biopelículas (Robledo *et al*, 2012). El segundo de los roles está relacionado con la infección primaria, siendo la celulasa CelC2 esencial en la entrada del rizobio al pelo radicular (Robledo *et al.*, 2008), etapa que está estrictamente regulada (Robledo *et al*., 2011).

Partiendo de esta base y apoyándonos en la existencia de homólogos/ortólogos del gen que la codifica en otros géneros como *Ensifer*, decidimos profundizar en las diferentes implicaciones de la celulasa CelC2 y su ortóloga en *Ensifer* en las diferentes etapas simbióticas, utilizando para este fin el sistema simbiótico modelo *Ensifer Medicago*, para el cual se han desarrollado multitud de herramientas de estudio, siendo éste el objetivo principal de la presente tesis doctoral.

Para conseguir este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar un análisis *in sílico* de las similitudes en el operón *celABC*, donde está contenido el gen *celC*, codificante de la celulasa CelC2, con otros miembros del género *Rhizobium* y géneros relacionados tanto a nivel de secuencia nucleotídica como aminoacídica.
2. Estudio de los potenciales reguladores de la expresión del gen *celC*
3. Obtención de transformantes de *E. meliloti* 1021 y *E. medicae* WSM419 que expresen heterólogamente la celulasa CelC2 de *Rhizobium*.
4. Obtención de transformantes de *E. medicae* WSM419 que sobreexpresen la celulasa CelC de dicha cepa.
5. Estudio de la produción de celulosa y formación de biofilms *in vitro* de *E. meliloti* 1021 y *E. medicae* WSM419 y sus correspondientes derivados que expresan la celulasa CelC2 de *Rhizobium*.
6. Estudio mediante microscopía óptica, de fluorescencia y confocal del proceso de colonización de superficies radiculares de *E. meliloti* 1021 y *E. medicae* WSM419 y sus correspondientes derivados que expresan la celulasa CelC2 de *Rhizobium*.
7. Análisis de la especificidad de la celulasa CelC2 en infección primaria en *Medicago* y *Trifolium* y estudio de las potenciales respuestas de defensa.
8. Estudio de la implicación de las celulasas CelC2 de *Rhizobium* y CelC de *Ensifer* en infección secundaria y desarrollo nodular en *Medicago truncatula*.

9. Evaluación de los fenotipos simbióticos obtenidos en la interacción con las diferentes cepas de estudio, analizando parámetros relacionados con el desarrollo vegetal.
10. Análisis de las características comunes entre la biosíntesis de celulosa bacteriana y biosíntesis de celulosa vegetal a partir del estudio *in sílico* de la similitud de las proteínas CelA y KORRIGAN en plantas y CelA y CelC en bacterias.
11. Expresión heteróloga de la celulasa CelC2 *in planta* mediante obtención de raíces transformadas en *Medicago truncatula* y análisis de la implicación de dicha celulasa en infección primaria, infección secundaria, desarrollo nodular y vegetal de las plantas transformadas.
12. Localización de la celulasa CelC2 en el interior del nódulo mediante técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos específicos diseñados para dicha celulasa.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Material biológico

1. 1 Cepas bacterianas

La gran mayoría de este trabajo fue realizado con las cepas *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *meliloti* 1021 y *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *medicae* WSM419, cedidas por el grupo de Ecología Genética de la Rizosfera del Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, situado en la Estación Experimental del Zaidín (EEZ), Granada (España).

Cuando fueron requeridas, se utilizaron cepas que se encontraban disponibles en el laboratorio y sus derivadas recombinantes, todas pertenecientes a la especie *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii.

Asimismo, se utilizaron 2 cepas recombinantes de la cepa *Rhizobium (Agrobacterium) rhizogenes* ARquaI para el desarrollo de los ensayos de transformación de raíces.

En las siguientes tablas (tabla 4, 5 y 6) se recogen las características más relevantes, así como las cepas recombinantes generadas a partir de dichas cepas.

Tabla 4. Cepas de *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *meliloti* 1021 utilizadas en este trabajo.

Cepa	Características	Referencia
1021	Derivada de SU47. Nod^+ Fix^+ Sm^R	Meade *et al*., 1982
1021 EV	Contiene pBBR1-MCS-2 ("*empty vector*") Sm^R Km^R	Este trabajo
1021 C2$^+$	Contiene pJZC2 (*celC*$^+$). Sm^R Km^R	Tesis Robledo, 2010
1021 lacZ	Contiene pXLGD4 Sm^R Tc^R	Este trabajo
1021C2$^+$ lacZ	Contiene pJZC2 (*celC*$^+$) y pXLGD4 (*lacZ*) Sm^R Km^R Tc^R	Este trabajo
1021 GFP	Contiene pHC60 (*gfp*) Sm^R Tc^R	Tesis Robledo, 2010
1021 RFP	Contiene pBHR-mRFP (*rfp*) Sm^R Tc^R	Este trabajo
1021 C2$^+$ GFP	Contiene pJZC2 (*celC*$^+$) y pHC60 (*gfp*) Sm^R Km^R Tc^R	Tesis Robledo, 2010

Tabla 5. Cepas de *Ensifer (Sinorhizobium) medicae* WSM419 utilizadas en este trabajo.

Cepa	Características	Referencia
WSM419	Cepa silvestre Nod^+ Fix^+	Rome *et al.*, 1996
WSM419 EV	Contiene pBBR1-MCS-2 ("*empty vector*") Km^R	Este trabajo
WSM419 C2$^+$	Contiene pJZC2 (*celC*$^+$). Km^R	Este trabajo
WSM419 EMC$^+$	Contiene pEMC$^+$ ("*celC*$^+$" WSM419) Sm^R Km^R	Este trabajo
WSM419 lacZ	Contiene pXLGD4 Tc^R	Este trabajo
WSM419 EMC$^+$lacZ	Contiene pEMC$^+$ ("*celC*$^+$" WSM419) y pXLGD4 (*lacZ*) Km^R Tc^R	Este trabajo
WSM419 GFP	Contiene pHC60 (*gfp*) Tc^R	Este trabajo
WSM419 EMC$^+$GFP	Contiene pEMC$^+$ ("*celC*$^+$" WSM419) y pHC60 (*gfp*) Sm^R Km^R Tc^R	Este trabajo

Tabla 6. Bacterias del genero *Rhizobium*, *R. leguminosarum* bv. trifolii (6 primeras filas) y *Rhizobium* (*Agrobacterium*) *rhizogenes* (2 últimas filas) que han sido utilizadas para este trabajo.

Cepa	Características	Referencia
ANU843	Cepa silvestre Nod^+ Fix^+	Rolfe *et al.*, 1982
ANU843 GFP	Contiene pHC60 (*gfp*) Tc^R	Robledo *et al.*, 2011
ANUΔC2843	Delección de 361pb en el gen *celC* (Δ*celC*)	Robledo *et al.*, 2008
ANU843C2$^+$	Contiene pJZC2 (*celC*$^+$) Km^R	Robledo *et al.*, 2011
ANU843C2$^+$GFP	Contiene pJZC2 (*celC*$^+$) y pHC60 (gfp) Km^R Tc^R	Robledo *et al.*, 2011
ANU843pBBFTGFP	Contiene pBBFTGFP, para fusiones transcripcionales, gen *gfp* sin promotor. Km^R	Este trabajo
ANU843pBBpcelCGFP	Contiene pBB*pcelC*GFP, (insercion 731 pb de *celB*) Km^R	Este trabajo
R200	Derivada de 2046 $Rif^R Sm^R$	Ausmess *et al.*, 1999
R204	Derivada de R201 (Tn5). Inserción en *celA*. Celulosa negativa.	Ausmess *et al.*, 1999
R211	Derivada de R201 (Tn5). Inserción en *celB*. Celulosa negativa.	Ausmess *et al.*, 1999
ARquaI pkEV	Derivada de ARquaI. Contiene pk7WG2D "empty vector" con GFP express. Sm^R Spt^R	Este trabajo
ARquaI pkcelC	Derivada de ARquaI. Contiene pk7WG2D con *celC* clonado por Gateway. Sm^R Spt^R	Este trabajo

Adicionalmente, en varios ensayos, se utilizaron las 18 cepas tipo pertenecientes al género *Ensifer (Sinorhizobium)*, que se detallan a

continuación (para más información, ver tabla 1 del apartado 5. 1 de la Introducción general).

1. *E. fredii* LMG6217^T
2. *E. saheli* LMG7837^T
3. *E. numidicus* LMG2490^T
4. *E. americanum* CFNEI156^T
5. *S. kostiense* LMG19227^T
6. *E. meliloti* ATCC9930^T
7. *E. medicae* USA 1037^T
8. *E. adherens* LMG20216^T
9. *E. garamanticus* LMG24692^T
10. *E. kummerowiae* CCBAV71714^T
11. *E. chiapanecum* ITTG570^T
12. *E. terangae* LMG7834^T
13. *E. mexicanum* ITTGR7^T
14. *S. morelense* LCO4^T
15. *E. arboris* LMG 14919^T
16. *E. sojae* LMG25493^T

Además de las cepas rizobianas anteriores, la cepa DH5**α** de *Escherichia coli*, fué utilizada para clonaje y almacenamiento de plásmidos con las construcciones necesarias (Sambrook *et al*., 1989), con la excepción del plásmido pHC60 que se encuentra alojado en la cepa S17.1. Cuando fue necesario se utilizó la cepa 803 como portadora de plásmidos "*helper*".

1. 2 Material vegetal

En este trabajo, tres especies de leguminosas fueron utilizadas: *Trifolium repens* o trébol blanco, *Medicago sativa* o alfalfa y *Medicago truncatula*.

Las semillas de *Trifolium repens* son de la variedad HUIA y las comercializa la casa comercial Batlle.

Las semillas de *Medicago sativa* pertenecen a la variedad Aragón y, al igual que las semillas de trébol blanco, las comercializa la casa comercial Batlle.

Las semillas de *Medicago truncatula* utilizadas en este trabajo pertenecen al cultivar Jemalong A17. Tanto las semillas de A17, utilizadas como *wild type*, como sus mutantes fueron cedidos por el grupo que dirige la Prof. Dr. Rebecca Dickstein (A17, *nip1* y *nip3*) en el Department of Biological Sciences de la University of North Texas (UNT, USA) y por el grupo que dirige el Dr. Jeremy Murray (A17 y *nfp*) en el Deparment of Cell and Development Biology del John Innes Centre (JIC, UK).

2. Técnicas microbiológicas básicas

2. 1 Medios de cultivo rutinarios

Las cepas de *Ensifer* y de *Rhizobium (Agrobacterium) rhizogenes* se cultivaron rutinariamente en medio TY modificado (Dazzo *et al.*, 1994) sólido durante 2-3 días a 28ºC y cuando fué requerido, en medio TY líquido a 28ºC y 150 - 180 rpm a tiempos determinados para cada ocasión.

Las cepas de *Rhizobium leguminosarum* se cultivaron rutinariamente en medio YMB solidificado (YMA; Vincent, 1970) durante 3-5 días a 28ºC. También en cultivo líquido cuando fué requerido.

Las cepas de *Escherichia coli* se cultivaron al igual que las anteriores pero utilizando medio LB (Luria-Berthani) y a 37ºC.

Todos los medios se prepararon con agua destilada y se autoclavaron a 121ºC durante 20 minutos. Para solidificar los medios de cultivo, se añadieron 15g/L de agar bacteriano europeo (Conda), con anterioridad al autoclavado.

Medio YMB	**1 L**
Manitol (Panreac)	7 g
$K_2 H PO_4$ (Panreac)	0,2 g
$Mg SO_4 . 7 H_2O$ (Panreac)	0,2 g
Extracto de levadura (Difco)	2 g

Medio TY	**1 L**
Bacto-Triptona (Difco)	5 g
Extracto de levadura (Difco)	3 g
$CaCl_2 2H_2O$ (Codex)	0,5 g

Medio LB	**1 L**
Bacto-Triptona (Difco)	10 g
Extracto de levadura (Difco)	5 g
NaCl (Panreac)	10 g

2. 2 Medios de cultivo para selección de transformantes

Para la selección de los transformantes de las cepas de estudio obtenidos por conjugación bi-triparental, se utilizó un medio definido, denominado Medio Mínimo sólido para *Rhizobium* (O'Gara y Shanmugam, 1976). Para determinar la posible presencia de *E. coli*, se utilizó el medio comercial VRBL (Scharlab).

Medio Mínimo	**g/L**
K_2HPO_4 (Panreac)	0,3 g
KH_2PO_4 (Panreac)	0,3 g
$MgSO_4.7\ H_2O$ (Panreac)	0,15 g
$CaCl_2.2H_2O$ (Codex)	0,05 g
NaCl (Panreac)	0,1 g
NH_4NO_3 (Sigma)	0,1 g
Manitol (Panreac)	10 g
Elementos traza	1mL
Solución vitaminas	1 ml

Ajustar a pH 6,8 7,0 con KH_2PO_4 o K_2HPO_4 y autoclavar. Añadir la solución de elementos traza y la solución de vitaminas después del autoclavado.

Solución de vitaminas	**mg/L**
Riboflavina	20 mg
Ac. p-aminobenzoico	20 mg
Ac. Nicotínico	20 mg
Biotina	20 mg
Tiamina HCl	20 mg
Piridoxina HCl	20 mg
Pantotenato cálcico	20 mg
Inositol	120 mg
Tampón fosfato sódico 0,05M pH7	1 L

*Todas las vitaminas son de la casa comercial Fluka.

Disolver en tampón Na_2HPO_4 0,05M pH7 y esterilizar por filtración. Es conveniente realizar una solución stock al menos 20 veces concentrada.

Elementos traza	**mg/mL**
$MnCl_2\ .\ 4H_2O$	4,3 mg
$CuSO_4\ .\ 5H_2O$	5 mg
$ZnSO_4\ .\ 7H_2O$	108 mg
H_3BO_3	145 mg
$FeSO_4\ .\ H_2O$	125 mg
$CoCl_2\ .\ 6H_2O$	59 mg
Na_2MoO_4	125 mg

*Todos los elementos traza son de la casa comercial Panreac.

Ajustar el pH a 5 y añadir 1g/L de EDTA (Fluka). Esterilizar por filtración. Es conveniente realizar una solución stock al menos 100 veces concentrada.

Medio VRB	**g/L**
Peptona	7 g
Extracto de levadura	3 g
Sales biliares	1,5 g
Lactosa	10 g
NaCl	5 g
Rojo Neutro	0,03 g
Cristal Violeta	0,002 g
Agar	15 g

2. 3 Antibióticos

Cuando fué necesario y según los plásmido utilizados, los medios de cultivo se suplementaron con los antibióticos pertinentes, recogidos en la siguiente tabla (tabla 7)

Tabla 7. Concentración de antibióticos (µg/mL) utilizados para suplementar los medios de cultivo de las cepas que lo requieran.

Antibióticos (µg/mL)	**Cepas**			
	E. coli	*E. meliloti*	*E. medicae*	*R.rhizogenes*
Kanamicina (Km)	50	200	50-200-300	-
Tetraciclina (Tc)	5	10	10	-
Cloramfenicol (Cm)	20	-	-	-
Ampicilina (Amp)	200	-	-	-
Estreptomicina/ Espectinomicina (Sm/Spt)	200	-	-	200

*Todos los antibióticos son de la casa comercial Sigma.

Se prepararon soluciones *stock* en agua destilada de cada uno a una concentración de 20 mg/mL. Se esterilizaron por filtración, excepto para la tetracilina, que se preparó un stock de 1mg/mL en una mezcla 1:1 de etanol-agua.

2. 4 Conservación de las cepas bacterianas

Las cepas se cultivaron rutinariamente en placas de TY/YMA/LB con los antibióticos apropiados, en el caso de que fueran necesarios. De una placa con cultivo fresco se recogió una colonia y se inoculó en tubos estériles con 4 mL de TY/YMA/LB líquido con dichos antibióticos y se incubó durante la noche a 37°C y 250 rpm en el caso de *E. coli* y a 28ºC y 180 rpm en el caso de *Ensifer* y *Agrobacterium*.

Se tomaron 700 µL de este cultivo y se mezclaron con 300 µL de glicerol previamente esterilizado en criotubos estériles, quedando a una concentración del 30%. Este procedimiento se realizó por triplicado y los tubos se conservaron a -80ºC.

3. Condiciones y medios utilizados para el cultivo de plantas.

3. 1 Medios de cultivo para plantas

Para el estudio de los fenotipos simbióticos, las leguminosas utilizadas en este estudio se cultivaron en ausencia de Nitrógeno, utilizando los medios detallados a continuación.

Medio Agar-Agua	**g/L**
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

Medio Fähraeus modificado (Vincent, 1970)

Reactivos	Cantidad en g/L (1X)	Cantidad en g/L (10X)
$MgSO_4 . 7H_2O$ (Panreac)	0,12	1,2
KH_2PO_4 (Panreac)	0,10	1,0
$Na_2HPO_4 . 2H_2O$ (Panreac)	0,15	1,5
Citrato férrico (Panreac)*	1mL	10 mL
$CaCl_2 . 2H_2O$ (Codex)*	1mL	10 mL
Solución de oligoelementos*	1mL	10 mL

*Estos reactivos se preparan a parte y se añaden después del autoclavado.

Se ajusta a pH 6,5-7,0 y se autoclava a 121°C durante 20 minutos.

Solución de oligoelementos	**Cantidad para 200mL (1mg/mL)**
$MnSO_4 . 2H_2O$	200 mg
$CuSO_4 . 5H_2O$	200 mg
$ZnSO_4 . 5H_2O$	200 mg
H_3BO_3	200 mg
Na_2MoO_4	200 mg

*Todos los oligoelementos empleados son de la casa comercial Panreac.

Solución de vitaminas	**Cantidades para 1 L**
Riboflavina	20 mg
Ac. p-aminobenzoico	20 mg
Ac. Nicotínico	20 mg
Biotina	20 mg
Tiamina HCl	20 mg
Piridosina HCl	20 mg
Pantotenato cálcico	20 mg
Inositol	120 mg
Tampón fosfato sódico 0,05M pH7	Enrasado a 1 L

* Todas las vitaminas utilizadas son de la casa comercial Fluka.

El citrato férrico se prepara a una concentración de 500mg/mL y se adiciona 1mL/L en una solución 1X de Fahraeus modificado. El $CaCl_2 . 2H_2O$ se prepara a una concentración de 100 mg/mL y se adiciona 1mL/L a la solución 1X después de esterilizada.

Cuando fué necesario, se agregó al medio 1X una solución de NH_4NO_3 a una concentración final de 5 mM. Para ello antes se preparo una solución *stock* a 50 mM de NH_4NO_3 (Sigma).

También, cuando fué requerido, se solificó el medio con 15 g/L de agar (Conda).

3. 2 Esterilización y germinación de semillas

3. 2. 1 Alfalfa y/o trébol

1. Poner semillas en un recipiente estéril.
2. Añadir etanol al 70% durante 30 s. Decantar.
3. Añadir $HgCl_2$ al 2,5% durante 2 minutos. Decantar.
4. Lavar con agua estéril repetidas veces, hasta que el agua salga clara.
5. Dejar reposar las semillas en agua y agitación, cambiando el agua cada hora aproximadamente.

Al final del día las semillas se esparcen en placas de medio Fahraeus sin Nitrógeno sólido (agarificado) o medio agar-agua (agar 1%) añadiéndose

1mL de agua destilada (para crear humedad). Se incubaron a 28ºC durante 2 días.

3. 2. 2 *Medicago truncatula*

1. Poner semillas en un recipiente estéril.
2. Añadir H_2SO_4 concentrado durante 10 minutos (en campana de extracción). Decantar y lavar con agua estéril 3 veces (o las necesarias para eliminar el ácido).
3. Añadir lejía comercial diluída al 10% durante 2 minutos. Decantar.
4. Lavar con agua estéril repetidas veces, hasta que el agua salga clara.
5. Dejar reposar las semillas en agua y agitación, cambiando el agua cada hora aproximadamente.

Al final del día las semillas se depositaron con cuidado y separadas una a una en placas de medio Fahraeus sin Nitrógeno sólido (agarificado) o medio agar-agua (agar 1%), añadiéndose 1mL de agua destilada (para crear humedad). Se incubaron a 4ºC durante 16 horas (durante la noche) y al día siguiente se pasaron a 28ºC durante 30 horas.

4. Ensayos in planta

4. 1 Ensayos de colonización e infección en placa

Estos ensayos se realizaron de acuerdo a protocolos estándar descritos por Vincent (1970). En el caso de *Medicago truncatula* se realizaron de acuerdo al Medicago handbook (versión 2006).

1. Esterilizar y pre-germinar las semillas.
2. Resembrar las cepas a inocular con el fin de que estén frescas para el día de la inoculación.
3. Preparar placas Petri o placas cuadradas (10x10 cm) con Fahraeus modificado (1X) con agar y dejar solidificar.
4. Una vez sólido, cortar la parte superior del agar, con el fin de dejar una cámara de aire para la parte aérea de la planta y colocar papel Whattman estéril del tamaño adecuado al tipo de placa.
5. Colocar 5 7 semillas pre-germinadas por placa cuadrada y/o 3 5 por placa Petri estándar.
6. Inocular con 200 µl/planta de una suspensión de la cepa a ensayar a una DO_{600} de 0,5. Para ello se resuspende el cultivo fresco de la cepa en cuestión en 30 mL de Fähraeus modificado 1X hasta llegar a la DO requerida.
7. Colocar otro papel Whattman estéril del tamaño adecuado encima de las semillas, con cuidado.

8. Sellar las placas con parafilm (realizando un agujero en la parte superior) y colocar un papel opaco que hará las veces de "suelo".

9. Mantener las placas en vertical en cámara a una temperatura de 24ºC, un fotoperíodo 16/8 y un 60% de humedad relativa.

10. Observar las plantas al microscopio óptico, de fluorescencia o confocal (según finalidad del ensayo) a tiempos determinados y fotografiar.

*Se utilizaron un mínimo de 10 plantas por experimento y se realizó un control de plantas sin inocular.

4. 2 Ensayo para la obtención de pelos radiculares de raíces de *Medicago truncatula.*

Este procedimiento se utiliza para recoger los pelos radiculares y extraer ácidos nucleicos y/o proteínas directamente de ellos, en cantidades muy pequeñas, con los kits comerciales adecuados.

Este protocolo se desarrolló en el John Innes Centre (JIC, Norwich, UK).

1. Poner un ensayo en placa en las condiciones descritas en el apartado 4. 1. Retirar el ensayo a un tiempo determinado, en este caso a 6 días post-inoculación.

2. En un recipiente con cobertura de teflón, depositar con mucho cuidado Nitrógeno líquido y esperar a la completa congelación del recipiente. También dejar congelar unas pinzas y un pincel fino.

3. Cortar la parte aérea y el meristemo radicular de las plantas e introducir la raíz lo más recta posible en el Nitrógeno líquido, que necesitará ser repuesto las veces necesarias para que siempre haya una capa en el recipiente.

4. Con el pincel fino, "peinar" la raíz con el fin de romper los pelos rdiculares, que estarán congelados.

5. Entre tratamiento y tratamiento, recoger los pelos radiculares en un tubo de teflón congelado.

6. Reservar las muestras a -80ºC hasta el momento de su uso (extracción de RNA)

4. 3 Ensayos de nodulación en tubo

Estos ensayos se realizaron de acuerdo a protocolos estándar descritos por Vincent, 1970.

1. Repetir lo descrito en el punto 1 y 2 del apartado anterior.

2. Preparar tubos con 20 ml de medio Fähraeus modificado y un papel de filtro de 15 x 1,5 cm estéril.

3. Colocar sobre el papel de filtro una semilla. Cerrar con un tapón de espuma y mantener en oscuridad e inclinados 45º durante 2 días.

4. Inocular cada tubo con 1mL de una suspensión $D.O._{600}$ 0,5 de la cepa correspondiente.

5. Mantener en cámara a una temperatura de 24ºC, un fotoperíodo 16/8 y un 60% de humedad relativa.

6. Controlar cada 48 horas, contando el número de nódulos hasta los 40 días después de la inoculación.

7. Observar y fotografiar los nódulos a la lupa estereoscópica (Nikon SMZ800).

8. Guardar nódulos en formaldehído (Sigma) al 4% para realizar cortes histológicos (apartado 8. 1)

*Se utilizaron un mínimo de 12 plantas por experimento y se realizó un control de plantas sin inocular.

4. 4 Ensayos de transformación de raíces

Se utilizó el protocolo estándard según Boisson-Dernier *et al.*, (2001) y de acuerdo con lo expuesto en el *Medicago* handbook (versión 2006).

1. Esterilizar semillas de *Medicago truncatula* (ver apartado 4. 2. 2).

2. Realizar un cultivo líquido suplementado con el/los antibióticos adecuados de cada una de las cepas de *Rhizobium rhizogenes* que llevan los plásmidos de interés e incubar a 28ºC y 180rpm durante una noche.

3. Sembrar en césped 100 µL del cultivo en una placa de TY suplementado con el/los antibióticos adecuados de cada una de las cepas e incubar 24 horas a 28ºC.

4. Preparar placas cuadradas (10x10 cm) de la manera expuesta en los puntos 3 y 4 del apartado 5. 1. Suplementar en medio con 25 µg/mL de kanamicina (evita proliferación de raíces laterales) y NH_4NO_3 5mM. En ocasiones, utilizar 0,1mM de aminoetoxivinilglicina (AVG, Sigma; inhibidor de síntesis de etileno)

5. Eliminar el meristemo apical de cada plántula y pasar por el cultivo en cesped de la cepa de *R. rhizogenes* correspondiente. Depositar la plántula en el papel de filtro previamente colocado. Colocar 7-10 plantas por placa.

6. Mantener 3 semanas en una cámara iluminada a 22ºC y fotoperíodo 16/8.

7. Chequear fluorescencia de las raíces (raíces transformadas correctamente expresan GFP) con una lupa de fluorescencia.

*Según la finalidad del ensayo, las plantas transformadas se pasaran a tubo, placa o invernadero, siguiendo las metodologías expuestas en el apartado 4. 1, 4. 3 y/o 4. 5.

4. 5 Ensayos de invernadero.

Estos ensayos se desarrollaron dentro del Servicio de Invernadero del Parque Científico de la Universidad de Salamanca (PC-USAL), situado dentro de las instalaciones del Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE).

4. 5. 1 Ensayos de producción

1. Esterilizar y pre-germinar las semillas.
2. Depositar 1 semilla por alvéolo (6,5x6,5x10 cm). Los alvéolos están llenos de vermiculita húmeda y esterilizada. Cada bandeja consta de 35 alvéolos.
3. Proteger las semillas con film transparente durante 2 días (*Medicago*) o 5 dias (*Trifolium*).
4. Inocular cada alvéolo con 1mL de una suspensión $D.O._{600}$ 0,5 de la cepa correspondiente.
5. Mantener bajo condiciones controladas de invernadero durante 3 meses o hasta que lleguen a producción. Regar 2-3 veces a la semana y fertilizar una vez a la semana con 250 mL de Fahraeus modificado sin/con Nitrógeno, según finalidad del experimento.
6. Fotografiar las plantas en fresco y tomar medidas de longitud aérea y radicular una vez transcurridos los 3 meses.
7. Secar las plantas en estufa a 60ºC durante 1 noche o a temperatura ambiente durante 2 semanas entre papeles de filtro.
8. Tomar pesos secos de raíz y de parte aérea.
9. Determinación de contenido en Nitrógeno total y de otros macro/microelementos mediante envío al Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC y posterior análisis mediante un analizador elemental C/N (Flash EA 1112 Series-Leco Truspec).
10. Tratamiento estadístico (ver apartado 9. 2).

4. 5. 2 Ensayos de producción de semillas

En este punto, se sigue la misma metodología que en el apartado anterior, desde el punto 1 al punto 5, con la excepción del tipo de sustrato, que en este caso sera una mezcla de tierra/vermiculita en proporción 3:1. Además varía el tiempo de recogida, que coincide con la maduración de las semillas en su vaina. El riego se realiza de igual manera, aumentando la cantidad de Fähraeus (en este caso suplementado con una fuente de Nitrógeno) en cuanto las plantas lo requieran.

5. Técnicas bioquímicas

La completa caracterización de las cepas transformantes obtenidas se lleva a cabo con la realización de técnicas tanto bioquímicas como moleculares. En este apartado se detallan las técnicas bioquímicas que se han utilizado en este trabajo.

5. 1 Detección de actividad celulásica.

La caracterización bioquímica de los mutantes que expresan la celulasa CelC2 se llevó a cabo mediante ensayos enzimáticos de alta sensibilidad descritos para *Rhizobium* según Mateos y colaboradores en 1992 (Mateos *et al.*, 1992).

5. 1. 1 Detección de actividad celulásica en cultivo celular. Ensayos en placa de doble capa.

1. Poner cultivos en placas de las cepas a analizar en sus medios y antibióticos correspondientes. Incubar a 28ºC durante 2-3 días.
2. Preparar CMC (Sigma) al 1% en agua (dejar en agitación "*overnight*"). Autoclavar.
3. Preparar PCA 500mM a pH5 (5X). Autoclavar. Diluir 5 veces en agua estéril para obtener PCA 100mM pH5 (1X).
4. Preparar doble capa de cultivo para crecimiento durante 3 días a 28ºC. En una placa Petri, depositar 15mL de YMA+agarosa 0,7% y dejar solidificar. Cuando esté solidificado, verter 5mL de CMC al 0,2%+0,5% agarosa en PCA 100mM pH5 (1X) y dejar solidificar. Incubar a 28ºC durante 3 días.

Reactivos. PCA 500mM (5X)	**g/500mL**
K_2HPO_4 (Panreac)	43,55 g
Ácido cítrico (Sigma)	52,50g

* Añadir 200 mL de ácido cítrico y 300 mL de agua destilada a 500 mL de fosfato dipotásico. Ajustar a pH5 con ácido cítrico.

Todas estas soluciones se deben realizar en frascos o botellas muy limpias, para eliminar cualquier resto que pueda interferir en el resultado.

Reactivo. Capa superior.	**Volumen**
CMC (Sigma) al 1%	10mL
Agarosa (Seakem)	0,25 g
PCA 1X (enrasar)	40 mL

5. Retirar cultivo de la placa con agua destilada con mucha precaución.
6. Teñir con una solución de Rojo Congo (Sigma) al 0,1% durante 30 minutos.
7. Realizar varios lavados con NaCl 1 M hasta que se diferencien claramente los halos que ponen de manifiesto la presencia de celulasa.
8. Fotografiar.

5. 1. 2 Obtención de extractos celulares por sonicación

1. Poner cultivo líquido de las cepas a ensayar. Inocular 30mL medio YMA/TY líquido a 180 rpm a 28ºC durante 3 días (fin de semana).
2. En tubos para el rotor de centrífuga JA 25.50, verter el cultivo líquido y centrifugar a 10000rpm (12000g) durante 10´ a 4ºC.
3. Descartar sobrenadante y añadir 20mL de agua estéril. Resuspender. Repetir centrifugación y descartar sobrenandante.
4. Resuspender en 500µL de agua estéril o tampón PCA 100mM pH5. Se puede guardar a -20ºC hasta su uso.
5. Poner muestras en vaso con hielo y dar 5 pulsos de 10´´ a 62 micrones a cada muestra, dejándolas descansar en hielo al menos 5´´(hacerlo de modo circular)
6. Centrifugar a 4ºC a 12000 rpm durante 12´.
7. Llevar el sobrenadante a nuevos tubos (recomendable usar eppendorf de 2mL a partir de ahora).
8. Separar 100µL para BCA y otros 100µL para los ensayos en doble capa y zimograma.
9. El sobrante se congela a -20ºC al igual que el pellet, que se reserva hasta el final del experimento.

5. 1. 3 Cuantificación de proteína total del extracto celular sonicado

5. 1. 3. 1 Absorbancia

1. Pipetear de 0,7 3 / 3 5 µL de agua estéril o tampón PCA 100mM pH5, según se haya utilizado en la obtención de los extractos. Depositar la tapa correspondiente, hasta que haga tope.

2. Medir utilizando la opción Protein-UV (595 nm) del Nanodrop (Bionova) y limpiar.

3. Pipetear la misma cantidad de muestra y repetir con todas las muestras disponibles en el momento.

5. 1. 3. 2 Método Bradford (Bio-Rad)

El protocolo Bio-Rad Protein Assay, que está basado en el método de Bradford, es el elegido para la determinación de la proteína total de los extractos celulares obtenidos. Es un ensayo colorimétrico simple y fiable para

dicha determinación y puede ser realizado en placas microtiter de 96 pocillos, permitiendo realizar muchas medidas a la vez.

1. Preparar la solución de teñido diluyendo 1:5 el Dye Reagent Concentrado en agua destilada. Filtrar para eliminar impurezas.
2. Preparar las diluciones para la curva patrón de seroalbúmina bovina (BSA). Se preparan de 0,05 mg/ml a 0,5 mg/ml (rango lineal).
3. Pipetear 10 µL de cada solución estándard y de las muestras a ensayar en el centro de pocillos separados. Cada muestra y cada estándard se añaden por triplicado.
4. Pipetear 200 µL del la solución de teñido diluida. Mezclar por pipeteo, poniendo cuidado de cambiar la punta de uno a otro.
5. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
6. Medir absorbancia a 595 nm en el lector de placas (ASYS UVM340).

5. 1. 4 Detección de actividad celulásica de los extractos celulares. Ensayos en doble capa.

1. En una placa Petri desechable (queda mejor en una cuadrada) poner 15 mL de agarosa al 0,7% en agua.
2. Dejar solidificar y verter 5 mL de CMC al 0,2%+0,5% agarosa en PCA 100mM pH5 (1X). Dejar solidificar.
3. Poner 5 µL de extracto de cada una de las cepas a ensayar y dejar que se absorba. Incubar *overnight* a 37ºC. Poner agua como control.
4. Sacar doble capa del extracto y revelar con Rojo Congo al 0,1% durante 30 minutos.
5. Lavar con NaCl 1M repetidas veces hasta ver los halos de hidrólisis enzimática, los cuales no se han teñido con el Rojo Congo.

5. 2 Electroforesis vertical de proteínas (SDS-PAGE)

Para separar las diferentes proteínas del extracto proteico y determinar la posición de la celulasa CelC2, se preparó una electroforesis vertical en condiciones no desnaturalizantes, para permitir la posterior renaturalización y detección de la proteína (Mateos *et al*., 1992). Para esto, se siguió un método basado en el descrito por Laemmli (Laemmli, 1970).

5. 2. 1 Preparación de la membrana de celulosa en soporte GelBond (Sigma)

1. Preparar 50 mL de CMC 0,2%+0,5% agarosa en PCA 100mM pH5 (1X). Dejar el stock a 4ºC. Se puede autoclavar. Fundir sólo antes de usar.
2. Lavar los cristales de 0,5 mm con agua y etanol, deben quedar bien limpios.

3. Comprobar la parte hidrofílica de la lámina Gel Bond y ponerla mirando hacia el cristal de 0,5 mm. Cubrir con el otro cristal y colocarlo en las pinzas y en el soporte (BioRad).
4. Fundir el gel y calentar ligeramente una pipeta Pasteur.
5. Introducir el gel líquido en la cavidad entre la lámina Gel Bond y el cristal de 0,5mm evitando burbujas. Dejar un rato hasta estar completamente sólido.
6. Extraer con cuidado del soporte y retirar el cristal protector y la lámina, procurando no despegar el gel de dicha lámina. Guardar en film a 4ºC hasta su uso.

* Precaución, solidifica muy rápido. Preparar por duplicado.

5. 2. 2 Preparación de los geles de poliacrilamida

1. Limpiar cristales de 0,75mm y los cobertores con agua y etanol al 70%, aclarar con agua destilada y dejar secar. Motarlos en su soporte. Asegurarse de que esta bien sellado por debajo. Cuando fué necesario se selló con grasa de caballo.
2. Preparar APS (BioRad) al 10%. Pesar 10 - 20 mg y ajustar con agua 100 µL por cada 10 mg. Se puede guardar a -20ºC durante máximo un mes.
3. Para el gel de separación (12%) se ponen los siguientes reactivos en un tubo de 20 mL por este orden:

Reactivo. Gel separación 12%.	**Volumen**
Agua destilada	4,5 mL
Tampón Tris-HCl 1,5M pH8,8	2,5 mL
Acri/Bis 40% 37,5:1 (Bio Rad)*	3,0 mL
APS 10%(Bio Rad)	50 µL
TEMED (Bio Rad)	5 µL

* Agitar muy bien el Acri/Bis.

4. Hacer una marca un poco por encima de donde va a ir el peine y llenar con la ayuda de una pipeta Pasteur.
5. Enrasar con butanol (hace que el gel quede recto, para que todas las muestras partan de la misma altura)
6. Esperar a que solidifique (tomar como referencia el sobrante en el tubo)
7. Retirar el butanol y aclarar con agua. Secar con una tira de papel.
8. Para el gel de empaquetamiento (4%) se ponen los siguientes reactivos en un tubo de 20 mL por este orden:

Reactivo. Gel empaquetamiento 4%.	**Volumen**
Agua destilada	3,25 mL
Tampón Tris-HCl 0,5M pH6,8	1,25 mL
Acri/Bis 40% 37,5:1 (Bio Rad)*	500 µL
APS 10%(Bio Rad)	25 µL
TEMED (Bio Rad)	5 µL

* Agitar muy bien el Acri/Bis.

9. Añadir encima del otro gel y colocar los peines. Esperar a que solidifique.
10. Añadir agua a los pocillos para lavar.
11. Secar con una tira de papel.

5. 2. 3 Preparación de la muestra para electroforesis vertical

1. Sacar los extractos sonicados y dejar descongelar.
2. Coger 15µL en un eppendorf pequeño y añadir 3µL de tampón de carga. Dar spin.

Reactivos. Tampón de carga.	**Volumen**
SDS (Panreac) (5% en TrisHCl 0,5M pH6,8)	5mL
Glicerol (Panreac)	3mL
Azul de bromofenol (0,5%) (Panreac)	200 µL
Agua destilada	1,6 mL

5. 2. 4 Electroforesis vertical

1. Montar la cubeta según instrucciones del fabricante (BioRad). Colocar los cristales de manera que el cobertor mire hacia dentro de la cubeta.
2. Llenar el espacio entre los dos cristales de tampón de cubeta. Añadir por encima de los pocillos y por los lados hasta que lleguen a la marca. Marcar los cristales para indicar el orden de las muestras.

Reactivos. Tampón de cubeta.	**Volumen**
Tris (hidroximetil) aminometano (Fluka)	3 g
Glicocola (BioRad)	14,4g
SDS (Sigma)	0,5g
Agua destilada (enrasar)	1L

3. Cargar 18 µL de agua entre cada muestra y en los pocillos inicial y final. Como marcador utilizar Precision Plus Protein (BioRad)
4. Correr electroforesis a 200V hasta que el frente alcance la goma verde (unos 45 minutos).

5. Retirar los cobertores y hacer un corte en la esquina superior izquierda para identificación de la muestra.
6. Retirarlo con cuidado a un baño de PCA 10mM pH5 (diluir 10 veces el 1X). Lavarlo durante dos horas, cambiando el tampón cada 30 minutos (renaturalización de proteínas).
7. Transportarlo a una cámara húmeda y cubrirlo con el Gel Bond. Incubar a 37ºC *overnight*.
8. Separar con cuidado el Gel Bond del gel de poliacrilamida.
9. El Gel Bond se lleva a una placa cuadrada con Rojo Congo al 0,1% durante 30 minutos. Lavar con NaCl 1M hasta que salga claro y dejarlo hasta el día siguiente para fotografiar.
10. El gel de poliacrilamida se lleva a un baño de azul Coomassie (Bio Rad) durante una hora en balanceo. Retirar el líquido y añadir agua durante al menos 30 minutos. Guardar para fotografiar.

5. 3 Cuantificación de la actividad celulolítica. Valoración de grupos reductores o BCA.

La actividad celulolítica se cuantificó por valoración de los grupos reductores formados tras la hidrólisis de su sustrato. El procedimiento seguido se fundamenta en el método descrito por Waffenschmidt y Jaenicke (Waffenschmidt y Jaenicke, 1987), modificado por Mateos y colaboradores (Mateos *et al.*, 1992).

5. 3. 1 Preparación de muestras enzimáticas para BCA.

1. Poner el thermoblock a 40ºC
2. Preparar mezcla de reacción: 100 µL del extracto sonicado de cada muestra, 400µL de CMC al 1% en agua y 1,1mL de PCA 100mM pH5 (1X).
3. Muestra representativa a tiempo 0: 750 µL de la mezcla de cada muestra y guardar a -80ºC.
4. Muestra representativa a tiempo 5: Incubar otros 750 µL a 40ºC durante 5 horas. Guardar a -80ºC hasta llevar a cabo la reacción de valoración.

* No olvidar añadir una muestra con agua destilada, que constituirá el blanco.

5. 3. 2 Reacción de valoración de grupos reductores

1. Preparación de reactivos A y B.

Solución A: 216 mg 4,4´dicarboxi-2,2´biquinolina (BCA, Sigma), 5,43g de Na_2CO_3 (Panreac), 2,42g $NaHCO_3$ (Panreac). Disolver carbonato y bicarbonato en 80 mL de agua. Enrasar a 100mL con agua destilada.

Calentar a 50ºC hasta que se disuelva y añadir el BCA, agitando cada poco. Dejar enfriar.

Solución B: 124 mg $CuSO_4$ $5H_2O$ (Panreac), 126 mg L-Serina (Sigma). Enrasar a 100 mL con agua destilada.

*Conservar a 4ºC máximo un mes y en ausencia de luz.

2. Poner el baño a 100ºC y preparar tubos de tapón de rosca limpios y secos, 3 por cada muestra y tiempo.
3. Prepara una mezcla 1:1 de las disoluciones A y B calculando 1mL por reacción.
4. Adicionar a cada tubo 800µL de agua destilada, 200 µL de la solución enzimática y 1mL de la solución A+B (3 repeticiones cada muestra y tiempo). Cerrar bien y vortear.
5. Incubar 15 minutos en el baño de 100ºC. Dejar que se enfríe a temperatura ambiente al menos 20 minutos.
6. Comprobar el color antes de medir. Si es muy oscuro (morado) diluir 1:1 con agua y cargar en placas de 96 pocillos y medir a 540 nm en el espectrofotómetro, no olvidando medir el blanco.
7. Extrapolar en una recta patrón de glucosa en concentraciones comprendidas entre 0,4 y 2.0 µg/mL, respecto a las que se cuantificó la actividad celulolítica.
8. Hacer media de las medidas de cada muestra y tiempo y restar el tiempo 0 del tiempo 5. Calcular las unidades enzimáticas (U=µg de glucosa x1,48). Si queremos calcular las Unidades específicas (A=U/mg proteína) tenemos que dividir entre los mg de proteína cuantificados por el método de Bradford.

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

5. 4 Purificación de la celulasa CelC2.

1. Poner un pre-inóculo (x4) de la cepa 1021C2$^+$ (elegida porque produce 6 veces mas celulasa que la ANU843 y derivadas) de 30 ml de TY+Km^{200} a 180rpm y 28ºC durante una noche (*overnight*).
2. Inocular matraces de 1L con 300mL de TY+km^{200} con los pre-inóculos anteriores. Incubar a 180rpm y 28ºC, durante 2 - 3dias. Inóculo total 1,2L.
3. Centrifugar a 12000 rpm 10 minutos y 4ºC, descartar sobrenadante.
4. Lavar con 20 ml de agua destilada estéril, centrifugar y descartar el sobrenadante.
5. Resuspender el pellet en 10 mL de Tris-HCl 100mM pH8.

6. En este paso, se puede parar y conservar a -80ºC o seguir el protocolo. *Opcional: agregar un inhibidor de proteasas para evitar la posible degradación de las enzimas (Cocktail Roche, 1 pastilla por cada 50 mL).
7. Limpieza y/o empaquetamiento de la columna de DEAE-Sepharosa. Pasar Tris-HCl 10mM pH8 repetidas veces hasta que lo que salga esté a pH 8.
8. Sonicar las muestras 10 segundos a 30 mV, 5 veces dejando un minuto en hielo entre sonicaciones.
9. Centrifugar el extracto sonicado crudo a 10000 rpm 12 minutos y 4ºC. Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo (éste contiene las proteínas liberadas). Guardar el *pellet* a -80ºC (en el caso de no detectar actividad celulásica, recurriríamos a un segundo sonicado de este *pellet*).
10. Cargar el extracto sonicado en la columna (añadiendo por los lados, evitando remover el contenido de la columna). Cargarlo todo, unos 40mL. Guardar lo que salga de la columna, que constituye el Eluído 1 (quizás contenga algunas proteínas, pero no la CelC2).
11. Pasar 50 mL de Tris-HCl 10mM pH8, que constituye el Eluído 2. De este paso recojemos el último mL y medimos concentración en el Nanodrop a una DO 280nm (0,2 µg/mL).
12. Pasar 150 mL de Tris-HCl 10mM pH8 con 0,25M NaCl y recoger fracciones de 5 mL. El NaCl, a esa concentración, desplaza la CelC2 junto con otras proteínas que probablemente eluirán a la misma concentración de NaCl.
13. De las fracciones que salgan (A1-X1), hacer un ensayo cualitativo de actividad celulásica (Double-Layer Plate). Incubar a 37ºC *overnight*.
14. Limpieza y/o empaquetamiento de la columna de Phenyl-Sepharosa. Pasar PCA 50mM pH 5 repetidas veces hasta que lo que salga esté a pH 5.
15. Teñir con Rojo Congo las placas durante 30 minutos y hacer repetidos lavados con NaCl 1M para ver la actividad.
16. Se eligen las fracciones con actividad (C1 y D1) y las 2 anteriores y posteriores y se corre una SDS-PAGE, para visualizar las proteínas eluídas.
17. Las fracciones con actividad se concentran y se dializan en tubos Amicon Ultra (Millipore) para volúmenes de hasta 15 ml. Se añaden los 5 ml en estos tubos y se centrifugan a 4000 rpm durante 15 minutos o hasta que la proteína esté concentrada en un volumen de 1 mL. Se añaden 4 ml de PCA 50 mM pH 5 y se mezcla. Centrifugar de nuevo hasta 1 ml y volver a llevarlo a 5 mL con PCA 50 mM pH 5. Recoger esto (guardar unos 100µL para ver si queda actividad residual. También guardar lo del fondo del Amicon).
18. Se pasan 50 mL de PCA 50 mM pH 5 + $(NH_4)_2SO_4$ 0,2 M por la columna de Phenyl Sepharosa y recoger el eluido.
19. Pasar la muestra dializada (unos 10 mL) y seguidamente pasar 50 mL de PCA 50mM pH 5. Guardar el eluido. Hacer un ensayo cualitativo de actividad celulásica (Double-Layer Plate). Incubar a 37ºC *overnight*.

20. Teñir con Rojo Congo las placas durante 30 minutos y hacer repetidos lavados con NaCl 1M para ver la actividad.
21. Con las fracciones que presenten actividad celulásica, dos anteriores y dos posteriores, correr una SDS-PAGE para ver cuál de ellas presenta una celulasa más pura.

5. 5 Determinacion de la producción de celulosa y la formación de biofilms.

5. 5. 1 Determinación cualitativa de la producción de celulosa.

1. Preparar medio YMA o TY convencional y suplementarlo con 25 mg/L de Rojo Congo (Sigma).
2. De un cultivo fresco, depositar cuidadosamente una colonia o un asa calibrada de 1 µL en el agar.
3. Incubar 2 3 días a 28º C.
4. Fotografiar.

* Después de fotografiar, se pueden guardar un día o dos a 4ºC y fotografiar. El color se intensifica después de este período de frío.

5. 5. 2 Formación de biofilms *in vitro*

Este procedimiento se llevó a cabo en placas microtiter de PVC (BD Falcon 353911 y 353913) que constituyen un soporte inerte para la adhesión y formación de biofilms bacterianos. Fué desarrollado en primera instancia por O'Toole *et al*., (1999) pero en este trabajo se utilizó el protocolo modificado por Fujishige *et al.,* (2006) y Hirsch (2008).

1. Se realiza un precultivo líquido * de 4 mL a 28ºC y 180 rpm. Se incuba hasta que la DO_{600} sea aproximadamente 2,0 (1 - 2 días).
2. Se hace una dilución 1:5 y se mide a DO_{600}. Se hacen los cálculos de cuanto cultivo añadiríamos para que queden a 0,2 (10^7 cel/mL)*.
3. Se cargan 100µL en cada pocillo, dejando la fila superior e inferior sin nada y rodeando la muestra con el medio estéril sin inocular, a modo de control.
4. Se sellan las placas y se incuban a 28ºC.
5. A tiempos definidos, se mide la DO_{595} en el lector de placas (se puede apreciar si hay o no diferencias en crecimiento*).
6. Eliminar el medio por aspiración y se le añade 100 µL/pocillo de una solución de cristal violeta al 0,3% durante 10 minutos.
7. Se elimina el CV por aspiración y el exceso se retira lavando 3 veces de 5 minutos cada una con SDW estéril*.
8. Se deja secar durante una hora en campana de flujo laminar, eliminando los restos de CV adheridos a las placas con un poco de alcohol.
9. Se añade 100µL/pocillo de una solución 80% etanol y 20% acetona para solubilizar los biofilms. Se incuba RT tapado durante 15 minutos*.
10. Medir absorbancia a DO_{570} en el lector de placas (ASYS UVM340).

*Observaciones. Se encontró que el medio RDM (*Rhizobium* Defined Medium) con 2% sacarosa es el mejor para observar biofilms en *Ensifer* (*Sinorhizobium)* pero igualmente se puede utilizar YMA, MM o TY. En ensayos de rutina uso TY, ya que con el producen menor cantidad de EPS.

Para 3 placas, preparar 4 mL de precultivo. El cálculo queda: 4mL x 0,2 = X x (DO medida x 5), siendo X la cantidad de precultivo a añadir. Adicionar TY hasta 4 mL.

No se pueden comparar microorganismos con diferentes patrones de crecimiento. A las 12 horas comienza a incrementarse la formación de biofilms. Normalmente para *Rhizobium* se usan tiempos a 24, 48 y 72 horas.

Se puede extender el tiempo de lavado, aunque es peligroso porque pueden arrastrarse los biofilms.

Separar lo pegado al fondo y resuspender lo mejor posible.

6. Técnicas de inmunohistoquímica.

6. 1 Producción de anticuerpos policlonales de la celulasa CelC2.

Para poder localizar la proteína CelC2 en los nódulos, se diseñó un anticuerpo específico para un parte conservada de dicha celulasa. El anticuerpo específico se produjo en conejo, inoculándolo con un péptido diseñado específicamente para una región de la CelC2, según está representado abajo.

La celulasa CelC2 se envió a la empresa Inmunostep (Parque Científico, Universidad de Salamanca), la cual se encargó de la producción y posterior purificación del anticuerpo específico.

Secuencias proteicas seleccionadas en primer lugar:
De Asn 103 a Gly 117: NVKPHVADTNNATDG (15 aminoácidos)
De Gly 168 a Asn 181: GFTGSDRDDGPVVN (14 aminoácidos)
De Ser 199 a Leu 212: SDAWKKLSDDGVEL (14 aminoácidos)
De Ser 229 a Ala 242: SLHDKPRPAEGFDA (14 aminoácidos)

Secuencia de aminoácidos de la proteína CelC2 (GeneBank reference CAD90973.1)

TNILSYASLLVVFVLLIGVTTSTMLKKLGRSMRRWRALLLAASVAVAP
GLPATAQQAMINADAWSAYKAKFLDPSGRIVDNGNGNISHSEGQGYGL
LLAYLSASPADFEQIWYFTRTELLLRDDGLAVWKWDPNVKPHVADTN
NATDGDMLIAYALALAGTAWKREDYILAASRMAQALLAETVGSSQGR
TLLMPGTEGFTGSDRDDGPVVNPSYWIYEAIPVMAALAPSDAWKKLSD
DGVELLKTMQFGPRKLPAEWVSLHDKPRPAEGFDAEFGYNAIRIPLYL
ARGGITDKALLVRLQKGMSQDGVPATIDLTTGRPKTVLSDPGYRIVND
VVACVVDGTRLPSSALQFAPALYYPSTLQLLGLAYIGEKHPECL

Código de colores
Marrón: Extremo carboxyterminal de la CelB
Azul: Péptido señal
Rojo: Centro catalítico (secuencia consenso de las GH8)
Verde: Fragmento eliminado por corte con BamHI y HinDIII
Morado: Fragmento consenso entre otras *celC* y receptor de adenosina
Dorado: Fragmento que coincide con el final de la CelE4 de *A. tumefaciens*
Subrayado: Motivos repetidos
Fondo azul: Secuencias seleccionadas para la producción del anticuerpo.
Péptido 1: NVKPHVADTNNATDG
Péptido 2: **SLHDKPRPAEGFDA**

Para la detección de la celulasa CelC2 tanto en cortes histológicos como el ELISA indirecto y Western Blot, se utilizó de manera rutinaria el péptido 2.

6. 2 ELISA indirecto

Para la optimización de las cantidades de anticuerpo a utilizar en las reacciones de inmunohistoquímica se realizó un ELISA indirecto, utilizando procedimientos estándard descritos a continuación.

1. Poner 30 mL de cultivo líquido de la cepa o cepas a estudio, durante al menos una noche. También se puede resuspender de una placa.
2. Centrifugar el cultivo a 10000 rpm durante 10 minutos a 4ºC. Decantar el sobrenadante y lavar con 20 mL de agua destilada estéril. Volver a centrifugar en las mismas condiciones y resuspender el pellet en 500 µL de PBS. Sonicar, siempre manteniendo en hielo, dando 5 pulsos de 10´´ con una potencia de 30 micrones. Centrifugar a 12000 rpm durante 12 minutos a 4ºC. Recoger el sobrenadante, que constituye el antígeno.
   *Recomendable realizar la muestra por duplicado para evitar contratiempos en el paso de sonicación. Si el antígeno lo constituyen células enteras, crecer cultivo o concentrarlo hasta una DO a 600nm de 20 y realizar diluciones.

Tampón PBS pH 7,2-7,4	**g/L**
Na_2HPO_4 (Panreac) 8 mM	1,148 g
KH_2PO_4 (Panreac) 1,5 mM	0,2 g
KCl (Panreac)	0,2 g
NaCl (Panreac)	8 g
Agua ó PBS	1L

3. Diluir 500 µL de extracto sonicado o cultivo en 4500 µL de PBS, o 1 mL en 10 mL. Se puede reducir o aumentar esta cantidad según el número de pocillos a utilizar.
4. Fijar 100 µL/pocillo del antígeno en PBS durante una noche en oscuridad. Si se quiere hacer mas rápido, se diluye el antígeno en tampón carbonato y se incuba al menos una hora a 37ºC. (Se puede hacer de las dos formas, pero si queremos comparar tenemos que hacerlo siempre del mismo modo)
5. Eliminar de un solo golpe seco la solución de antígeno.
6. Lavar 3 veces con 300 µL/pocillo de NaCl-Tween. En el último lavado secar bien dando golpes secos. Precaución de no contaminar pocillos vecinos.

NaCl-Tween	**g/L**
NaCl (Panreac)	9 g
Tween 20 (Sigma)	0,5 mL
Agua o PBS	1 L

7. Agregar 300 µL/pocillo de tampón de saturación e incubar a 37ºC durante 30 minutos en oscuridad.
8. Eliminar tampón de saturación mediante un golpe seco y sin lavar, añadir 100 µL/pocillo de la dilución de anticuerpo correspondiente (diluir anticuerpo en PBS-Tween). La dilución del anticuerpo es variable según ensayo. Incubar una hora a 37ºC en oscuridad.
9. Eliminar de un solo golpe seco el anticuerpo.
10. Lavar los pocillos 3 veces con 300 µL/pocillo de NaCl-Tween. Eliminar bien la solución de lavado mediante golpes secos.
11. Añadir 100 µL/pocillo del conjugado correspondiente, en este caso anti-rabbit IgG diluido 4000 veces (para una placa 3 µL de conjugado y

11.997 µL de PBS-Tween, determinar dilución aunque suele ir bien ésta) e incubar durante una hora a temperatura ambiente y oscuridad.

12. Eliminar el conjugado con un golpe seco y lavar 4 veces con 300 µL/pocillo NaCl-Tween. Secar bien dando golpes secos.
13. Añadir 100 µL/pocillo de la solución de sustrato o revelado durante 30 minutos a temperatura ambiente y agitación constante.

Solución de revelado (**preparar en el momento de uso**)

Tampón citrato	10 mL	12 mL	42 mL	52 mL	62 mL
Solución ABTS	0,2 mL	0,24 mL	0,84 mL	1,04 mL	1,24 mL
Solución H_2O_2	0,2 mL	0,24 mL	0,84 mL	1,04mL	1,24 mL

Tampón citrato 100 mM pH 4,2 (**ajustar NaOH 10 M**)

Acido cítrico (Sigma)	21,01 g
Agua	1L

Solución ABTS 52mM (**almacenar a 4ºC y en oscuridad**)

ABTS (Roche)	2,86 g	0,286 g	0,143 g	0,0715 g
Agua	100 mL	10 mL	5 mL	2,5 mL

Solución H_2O_2 (**almacenar a 4ºC y en oscuridad**)

H_2O_2 30%	12,5 µL	125 µL
Agua	1 mL	10 mL

14. Leer a 405 nm en un lector de placas (ASYS UVM340).

6. 3 Western Blot

6. 3. 1 Preparación de muestras y cuantificación de proteína total

Procedimientos descritos en los apartados 5. 1. 2 y 5. 1. 3

6. 3. 2 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Procedimiento descrito en el apartado 5. 2. 2

6. 3. 3 Preparación de muestras

1. Poner 15 µL de muestra (a veces es necesario diluir con SDW, según la cantidad de proteina total) y 3 µL de tampón de carga (3X SDS Sample Buffer +DTT 1M, NEB). Hervimos 10 minutos. Cargar los 18 µL.

2. Cargar 5 µL de standard de proteína (Prestained SDS-PAGE Standard Low Range, Bio-Rad)

3. Llenar con tampón de cubeta el espacio entre los dos cristales y llenar cubeta hasta la goma verde. Poner a un voltaje constante de 200V durante 40 minutos aprox.

6. 3. 4 Transferencia a membrana de nitrocelulosa

1. Al retirar geles, diferenciarlos haciendo cortes en las esquinas (apuntar).

2. Equilibrar los geles 15 minutos en agitación en tampón de transferencia, juntos a los geles, en otro recipiente poner los sándwiches y las esponjas también bañados con el tampón de transferencia. Después, colocar como como indica la figura 23.

Tampón de transferencia	**1 L**
Tris (Fluka)	5,81 g
Glicina (Biorad)	2,93 g
SDS (Sigma)	0,375 g
H_2O mili Q	800 mL
Metanol (Panreac)	200 mL

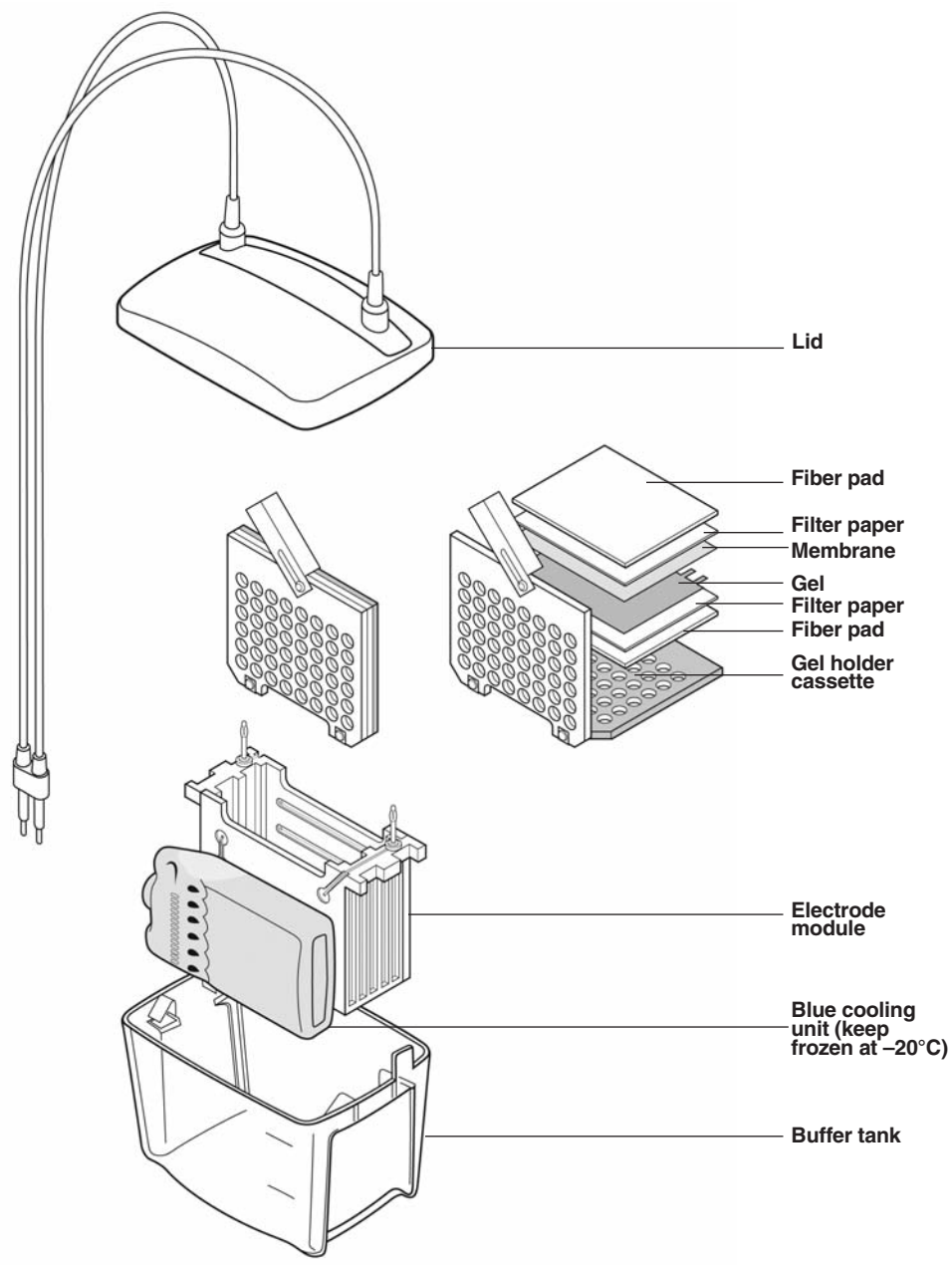


Figura 23. Esquema de ensamblaje de partes del sistema Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad).

3. Llenar el tanque con tampón de transferencia y poner el imán agitador.

4. Transferir durante 1 hora a 100 V sobre un agitador magnético.

5. Marcar las membranas igual que los geles y teñirlas con Rojo Ponceau (Sigma) durante 10 minutos.

6. Lavar con H_2O mQ hasta que se vean bien las bandas y no haya mucho fondo (Prueba de una correcta transferencia y sin burbujas). Seguir con el Western o podemos secar y guardar a 4ºC.

*Opcional: Teñir los geles de poliacrilamida como está descrito en el apartado 5. 2. 4. Se va a transferir la gran mayoría y no habrá tinción en la mayor parte de los casos

6. 3. 5 Revelado de la membrana de nitrocelulosa

1. Después de la tinción de Rojo Ponceau, secar la membrana y escanear o fotografiar para ver si ha habido burbujas.
2. Cortar membrana, si es necesario, y colocarla en un recipiente adecuado al corte que le hemos hecho.
3. Incubar cada corte con tampón de saturación (1% leche descremada en polvo, Molibco-Sveltesse) durante 30 minutos en agitación (750 µL en Trays, 3 mL entero o 5 mL si la membrana es grande). Si no está bien lavado el Rojo Ponceau, poner tampón de saturación durante 10 minutos y si vemos que aún está rojo, cambiarlo y dejar otros 20 minutos en agitación.
4. Retirar cuidadosamente el tampón de saturación y añadir el anticuerpo en tampón de dilución (1/3 tampón de saturación), diluido 1/5 (determinar para los distintos anticuerpos). Incubar al menos 2 horas en agitación y temperatura ambiente. También se puede dejar *overnight*.
5. Lavar 3 veces durante 5 minutos cada vez con una solución 0,05% Tween20 en TBS (750 µL en Trays, 3 mL entero, 5 mL si la membrana es grande…). Mientras se lava, preparar solución de sustrato A y B, que tardará un rato en disolver. No mezclar hasta su uso.

Tampón TBS	**g/L**
Tris 20 mM	2,42
NaCl 500 mM	29.22

*Ajustar a pH 7,5 con HCl concentrado.

Solución de sustrato (**revelado, mezclar antes de uso**)

Solución A (mantener en oscuridad, agitando un poco)	10 mL metanol 30 mg 4-cloro-naftol (1 pastilla)
Solución B	50 mL TBS 30 µL H_2O_2 30%

6. Incubar con la solución de conjugado (anti-rabbit peroxidasa 1/500) durante 1 hora a temperatura ambiente (o 37ºC) y agitación (750 µL en Trays, 3 mL entero o 5 mL si la membrana es grande).
7. Lavar 5 minutos con TBS sin Tween en agitación (3 veces).
8. Añadir la solución de sustrato (750 µL en Trays, 3 mL entero o 5 mL si la membrana es grande) preparada antes de ser utilizada (ahora mezclar soluciones A y B).

9. Incubar en agitación hasta la aparición de la/s banda/s.
10. Lavar abundantemente la membrana con agua y dejar secar. Conservar en oscuridad.
11. Fotografiar.

7. Técnicas de Biología Molecular

7. 1 Obtención y cuantificacion de ácidos nucleicos

7. 1. 1 Extracción de DNA total

7. 1. 1. 1 Extracción con NaOH

Este protocolo se puso a punto en nuestro laboratorio para la extracción de DNA cromosómico de *Rhizobium* de alta pureza (Rivas et al., 2001) con pequeñas modificaciones (Rivera TD, 2013).

1. Centrifugar un cultivo (4 mL) de la cepa a ensayar a 13000 rpm durante 3 minutos a 4°C.
2. Resuspender en 1000 µl TE pH 7.4, repartir en 2 epp con 500 µl, adicionar 50 µl de lisozima (50mg/ml) e incubar 37°C durante 45 minutos.
3. Adicionar 70 µl de SDS al 10% y 6 µl proteinasa K a una concentración de 10 mg/ml e incubar 65°C durante 10 minutos.
4. Centrifugar a 10.000 rpm durante 3 minutos. Eliminar sobrenadante.
5. Añadir al pellet 200 µl de NaOH 0.05 M y vortear. Después, calentar a 100°C durante 4 minutos.
6. Añadir 200 µl de agua miliQ, resuspender por inversión y centrifugar a 6000 rpm durante 3 minutos.
7. Llevar 200 µl del sobrenadante a un nuevo eppendorf.
8. Fenolizar (para una mayor pureza): Añadir 1:1 vol (200 µl) de fenol / cloroformo / isoamílico (25:24:1) y vortear. Centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Tomar la interfase superior en nuevo tubo (+/-200 µl).
9. Añadir 1:1 (200 µl) de cloroformo / isoamílico (24:1) vortear, centrifugar 12000 rpm 5´ a 4°C, tomar la interfase superior en nuevo tubo (+/-200 µl).
10. Añadir 4 volúmenes (800 µl) de EtOH 100% (Merck, -20 °C) + 7 µl de AcONa (Panreac) por cada 100 µl de DNA (7 µl); agitar por inversión.
Guardar a 80°C durante 2h si urge utilizar o a 20 °C durante 12 h mínimo.
10. Centrifugar 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C y decantar sobrenanadante.
11. Secar en el Speed Vac durante 15 30 minutos.
12. Resuspender en 50 µl de agua miliQ.
13. Calentar a 15 minutos a 42°C en un termoblock.

14. Dejar reposar 30 minutos a temperatura ambiente y repartir en eppendorf para distintos usos.
15. Cuantificar en Nanodrop (Bionova). Guardar a -20ºC.

7. 1. 1. 2 Extracción de DNA total por lisado bacteriano

Este protocolo de extracción rápida se puede utilizar en los casos en que no se requiera un DNA de alta pureza (Tesis Rivera, 2013).

El buffer de lisis contiene NaOH que ayuda a romper la pared celular y destruye los puentes de Hidrógeno entre las bases de DNA, convirtiéndolo en DNA de cadena simple. También contiene SDS que solubiliza las membranas celulares y desnaturalza la gran mayoría de las proteínas.

1. Preparar buffer de lisis (0,25%SDS+0,05M NaOH).

Buffer de lisis	**g/100 mL**
NaOH (Panreac)	0,2
SDS (Sigma)	0, 25

2. Resuspender una colonia (o asa calibrada 1 µL) en 50 µL de buffer de lisis en un tubo eppendorf y vortear durante 60 segundos.
3. Calentar a 95ºC en termoblock durante 15 minutos.
4. Centrifugar el lisado durante 10 minutos a máxima velocidad.
5. Recoger 10 µL de sobrenadante y llevarlo a otro eppendorff con 90 µL de agua destilada estéril.
6. Cuantificar en Nanodrop (Bionova).
7. Guardar a -20ºC hasta su uso (recomendado 1µL/reacción de PCR).

7. 1. 1. 3 Extracción de DNA total con Kit Comercial REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit (Sigma)

Este kit es muy rápido y se obtienen los resultados óptimos cuando con posterioridad se utiliza el mix de Taq polimerasa que contiene el kit. Instrucciones del fabricante, con pequeñas modificaciones.

1. En un tubo eppendorf poner 100 µL de "*Extraction Solution*".
2. Picar una colonia y adicionar al tubo. Agitar en vórtex brevemente.
3. Incubar a 95ºC durante 10 minutos en thermoblock.
4. Añadir 100 µL de "*Dilution Solution*" y mezclar.
5. Centrifugar durante 4 minutos a 6000 rpm.
6. Recoger los 100 µL superiores y medir concentración DNA con el Nanodrop (Bionova).
7. Guardar a -20ºC para su uso posterior.

7. 1. 1. 4 Extracción de DNA total con Kit Comercial Speedtools Plant DNA Extraction Kit (Biotools).

Este kit comercial es rápido y además se obtiene un DNA de alta pureza y en una buena concentración. Instrucciones del fabricante, con pequeñas modificaciones.

1. Poner un cultivo líquido de las cepas a ensayar de 4 mL a 180 rpm *overnight*.
2. Centrifugar en tubos eppendorff a 6000 rpm durante 5 minutos. Descartar el sobrenadante.
3. Resuspender en 400 µL de *Buffer* L (lisis) y 20 µL de proteinasa K (10 mg/mL). Dar un suave vórtex.
4. Incubar a 65ºC durante 30 minutos en un termoblock, agitando por inversión varias veces.
5. Transferir el lisado a una columna de prefiltrado acoplada a un tubo de 2 mL y centrifugar 1 minuto a 12000 rpm. Descartar la columna.
6. Añadir 200 µL de *Solution P* y vortear.
7. Transferir a una "*Binding column*" acoplada a un tubo de 2 mL e incubar durante 1 minuto.
8. Centrifugar 1 minuto a 12000 rpm. Descartar el filtrado.
9. Añadir 550 µL de *Buffer* W1 y centrifugar 1 minuto a 12000 rpm. Descartar el filtrado.
10. Añadir 550 µL de *Buffer* W2 y centrifugar 1 minuto a 12000 rpm. Descartar el filtrado. Repetir este paso.
11. Centrifugar 2 minutos a 12000 rpm.
12. Colocar la columna en un eppendorff de 1,5 mL y añadir en el centro de la columna 30 µL de 1/10 *Buffer* E (o SDW). Incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos.
13. Centrifugar 1 minuto a 10000 rpm. Descartar la columna.
14. Cuantificar en Nanodrop (Bionova).
15. Guardar el eluido a -20ºC hasta su uso.

7. 1. 2 Extracción de DNA plasmídico

7. 1. 2. 1 Extracción DNAp por lisis alcalina

Se utilizó cuando fue necesario extraer DNA de un megaplásmido al no amplificar con kits comerciales (Sambrook *et al.*, 1989)

1. Recoger 1,5 mL de cultivo líquido en fase exponencial (2 días).
2. Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos a 4ºC.
3. Lavar con 500µL de Sarcosyl al 0,1% en TE y volver a centrifugar retirando el sobrenadante y dejar el *pellet* bien seco, retirando cualquier resto que haya quedado por las paredes del tubo.

TE. 10X pH7, 4	**Concentración final**
Tris-HCl pH 7,4	100 mM
EDTA (Sigma) pH 8	10 mM

Sarcosyl 0,1 % en TE	**g/100 mL**
Sarcosyl (Sigma)	0,1g
TE	100 mL

4. Resuspender células en 100 µL de lisozima (4mg/mL) disuelta en Solución de Lisis Alcalina I (Tabla 8). Dar vórtex.
5. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Añadir 200 µL de Solución de Lisis Alcalina II (Tabla 8) y homogeneizar por inversión unas 5 veces, bañando toda la pared del tubo. Mantener en hielo 5 minutos.
7. Añadir 150 µL de Solución de Lisis Alcalina III (Tabla 8) (a 4ºC; neutralización y precipitación proteínas). Invertir varias veces e incubar 5 minutos en hielo (minimiza daños por DNAsas celulares).

Tabla 8. Composición de soluciones para extracción de DNAp.

Solución I (4ºC)	**Concentración stock**	**Concentración final**	**Para 5 mL**
Glucosa (Panreac)	0,5 M	50mM	500 µL
Tris-HCl pH8	1 M	25 mM	125 µL
EDTA (Sigma)	0,5 M	10mM	100 µL
H_2O miliQ			4,275 mL
Solución II	**Concentración stock**	**Concentración final**	**Para 5 mL**
NaOH (Panreac)	10M	0,2 M	100 µL
SDS(Sigma)	10 %	1%	500 µL
H_2O miliQ			4,4 mL
Solución III	**Concentración stock**	**Concentración final**	**Para 5 mL**
Acetato potásico pH4, 8 (Panreac)	5M	3M	3 mL
Ácido acético glacial (Panreac)	100%		575 µL
H_2O miliQ			1,43 mL

8. Centrifugar a máxima velocidad a 4ºC durante 5 minutos y recoger sobrenadante en tubo nuevo (tomar nota de lo recogido).
9. Añadimos un volumen de fenol : cloroformo : isoamílico 25:24:1 (v/v/v) y agitar vigorosamente o vórtex.
10. Centrifugar a 13000 durante 5 minutos y recogemos la fase acuosa (superior) en otro tubo.
11. Añadir un volumen de cloroformo : isoamílico 24:1 (evita restos fenol), mezclar y centrifugar de nuevo durante 5 minutos.
12. Recoger la fase superior acuosa en otro tubo y añadir 2,5 volúmenes de etanol absoluto (-20ºC, precipita DNA).
13. Dejar 5 minutos a temperatura ambiente (evitamos precipitación de DNA genómico)
14. Centrifugar a máxima velocidad un minuto, decantar y añadir 200 µL de etanol al 70%.
15. Dejar secar (aire o *Speed Vac*) y resuspender en 25 µL de agua miliQ estéril. Cuantificar en Nanodrop (Bionova). Guardar a -20ºC.

7. 1. 2. 2 Extracción DNAp mediante Kit comercial Speedtools Plasmid DNA Kit (Biotools)

Este kit esta diseñado para extraer DNA plasmídico de *E. coli*, aunque también se puede extraer DNA plasmídico de *rhizobia* realizando algunas modificaciones (aumentar 100 µL mas el *buffer* L, limpiando las celulas de exopolisacárido previo al comienzo del kit). Instrucciones del fabricante, con pequeñas modificaciones.

1. Transferir un cultivo líquido *overnight* de 0,5 mL a 2 mL a un tubo de 2 mL. Centrifugar 1 minuto a velocidad máxima y descartar el sobrenadante.
2. Resuspender el pellet en 250 µL de *Buffer* R y vortear.
3. Añadir 250 µL de *Buffer* L y mezclar por inversión 5 veces. No dejar los tubos más de 5 minutos ni vortear.
4. Añadir 250 µL de *Buffer* N y meclar con cuidado invirtiendo el tubo 4-6 veces. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad.
5. Transferir sobrenadante a una columna (Biotools Binding Column). Incubar 1 minuto y luego centrifugar 1 minuto a 10000 rpm. Descartar filtrado.
6. Añadir 750 µL de *Solution* W y centrifugar 1 minuto a 10000 rpm. Descartar filtrado. Repetir.
7. Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad. Descartar filtrado.
8. Colocar la columna en un tubo ependorff de 1,5 mL y añadir al centro de la columna 30 µL de 1/10 *Buffer* E. Incubar 1 minuto y centrifugar otro minuto a 10000 rpm.
9. Cuantificar en Nanodrop (Bionova).

10. Guardar eluido a -20ºC para su posterior uso.

7. 1. 3 Extracción y limpieza de RNA

7. 1. 3. 1 Extracción de RNA total mediante Kit Comercial Rneasy Mini Kit (Qiagen)

Instrucciones del fabricante, con pequeñas modificaciones.

Antes de comenzar:

- Todos los materiales utilizados han de estar muy limpios y secos. Limpiar superficies, pipetas y demas material con RNAseZAP (Sigma). Elegir material de laboratorio libre de DNAsas y RNAsas, y puntas con filtro. Autoclavar y secar en estufa todo el material envuelto en aluminio.
- Buffer RLT: Añadir 10 µl de ß-mercaptoetanol por cada 1 mL de buffer.
- Buffer RPE: Añadir 4 volúmenes de etanol (96-100%) al frasco.

1. Transferir un cultivo líquido *overnight* de 0,5 mL a 2 mL a un tubo de 2 mL. Centrifugar 1 minuto a velocidad máxima y descartar el sobrenadante.
2. Añadir 450 µl de *Buffer* RLT.
3. Mezclar muy bien por vórtex o con pipeta.
4. Añadir 0,5 volúmenes de etanol 100% y mezclar por pipeteo. No centrifugar.
5. Transferir hasta 700 µL de la muestra a la columna "*Rneasy spin column*". Centrifugar 15 segundos a 10000 rpm y descartar el sobrenadante. Si hay más de 700 µl, utilizar varias columnas.
6. Añadir 700 µl de *Buffer* RW1 en el centro de la columna. Centrifugar 15 segundos a 10000 rpm y descartar el sobrenadante.
7. Añadir 500 µl de *Buffer* RPE en el centro de la columna. Centrifugar 15 segundos a 10000 rpm y descartar el sobrenadante.
8. Repetir el paso anterior pero centrifugando durante 2 minutos.
9. Transferir la columna a un eppendorf y centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
10. Transferir la columna a un nuevo eppendorf de 1,5 mL y pipetear 30 µl de agua libre de nucleasas en el centro de la columna. Centrifugar 1 minuto a 10000 rpm.
11. Cuantificar en Nanodrop (Bionova).
12. Guardar el RNA eluido a -80ºC o proseguir con la limpieza de DNA genómico (ver apartado 7. 1. 3. 3 y 7. 1. 4).

7. 1. 3. 2 Extracción de RNA total de cantidades pequeñas mediante Kit Comercial RNeasy Micro Kit (Qiagen)

Instrucciones del fabricante, con pequeñas modificaciones. Este kit comercial fue utilizado para la extracción de RNA de los pelos radiculares, ya que permite extraer RNA de cantidades muy pequeñas (desde 500 células).

Antes de comenzar:

- Todos los materiales utilizados han de estar muy limpios y secos. Limpiar superficies, pipetas y demas material con RNAseZAP (Sigma). Elegir material de laboratorio libre de DNAsas y RNAsas, y puntas con filtro. Autoclavar y secar en estufa todo el material envuelto en aluminio.
- *Buffer* RLT: Añadir 10 µl de ß-mercaptoetanol por cada 1 mL de *buffer*.
- *Buffer* RPE: Añadir 4 volúmenes de etanol (96-100%) al frasco.

1. Recoger un máximo de 5 x 10^5 células y añadir 350 µL de *buffer* RLT. Homogenizar.
2. Añadir un volúmen de etanol 70% (Merck, diluido en agua *RNase-free*) al lisado y mezclar por pipeteo. No centrifugar.
3. Transferir a una columna "*RNeasy MinElute spin column*" acoplada a un tubo de 2 mL. Centrifugar 15 segundos a 10000 rpm. Descartar el filtrado.
4. Añadir 350 µL de *Buffer* RW1 y centrifugar 15 segundos a 10000 rpm. Descartar el filtrado.
5. Añadir 500 µL de *Buffer* RPE y centrifugar 15 segundos a 10000 rpm. Descartar el filtrado.
6. Añadir 500 µL de etanol al 80% (Merck, diluido en agua *RNase-free*) y centrifugar 2 minutos a 10000 rpm. Descartar flitrado y tubo.
7. Poner la columna en un nuevo tubo de 1,5 mL y añadir 14 µL de agua *RNase-free* al centro de la columna. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
8. Cuantificar en Nanodrop.
9. Guardar el eluido a -80ºC hasta su uso o seguir con el protocolo de limpieza de DNA genómico (apartado 7. 1. 3. 3 y 7. 1. 4).

7. 1. 3. 3 Purificación RNA

Para eliminar el DNA genómico residual de las extracciones de RNA se utilizó la DNAse I de Fermentas, ahora Thermo-Fischer, según el protocolo recomendado por ellos (Wiame *et al.,* 2000).

1. Preparar el siguiente mix (tabla 9) en un microtubo libre de RNAsas:

Tabla 9. Reacción de digestión de DNA genómico residual.

Reactivos	**Volumen 10 mL**
RNA	Hasta 1 µg
10X Reaction Buffer (+$MgCl_2$)	1 µL
DNAse I, RNAse-free	1 µL (1U)
Agua DPEC	Completar hasta 10 µL

2. Incubar 30 minutos a 37ºC.
3. Añadir 1 µL de EDTA 50 mM e incubar 10 minutos a 65ºC.
4. Guardar a -80ºC hasta su uso.

Comprobar su limpieza/pureza mediante PCR convencional.

7. 1. 4 Síntesis de DNA complementario (cDNA).

Para la síntesis de DNA complementario a partir de RNA tratado con DNAsa I (limpio) se utilizó la High Retrotranscriptase (Biotools), según las intrucciones del fabricante. Es una nueva transcriptasa reversa recombinante producida en *E. coli*. Carece de actividad RNAsa y presenta gran afinidad por RNA. Es activa y estable en un amplio rango de temperatura, por lo que puede transcribir moldes RNA ricos en %GC o con elevado porcentaje de estructuras secundarias sin la incorporación de aditivos de reacción.

El protocolo a seguir es el siguiente:

1. Preparar la mezcla de molde/primer en microtubos como se detalla a continuación en la tabla 10 y mantener en hielo.

Tabla 10. Mezcla RNA molde/primer.

Reactivos	**Concentración Final**	**Volumen por rxn 20 µL**
RNA molde	* Variable	X µL
Primer	** Variable	X µL
Agua libre nucleasas	-	Hasta 15 µL

*10 ng a 5 µg de RNA total

** Oligo $(dT)_{15}$ (Invitrogen) para plantas: 1-10 µM; Hexameros Ramdom (Invitrogen) para bacteria: 150-250 nM; Primer específico: 0,1-1 µM.

2. Incubar a 95ºC durante 2 minutos (desnaturalización). Enfriar y mantener en hielo.
3. Preparar la mezcla de reacción en hielo como sigue a continuación en tabla 11. Preparar suficiente mezcla para el número de reacciones requerido, incluyendo controles. Mantener el hielo.

Tabla 11. Mezcla de reacción para síntesis de cDNA.

Reactivos	**Concentración final**	**20 µL rxn**
10X High RT Reaction Buffer	1 X	2 µL
100mM $MgSO_4$ *	3 mM	0,6 µL
Agua libre nucleasas	-	Hasta 5 µL
dNTP (Invitrogen)	0,2-0,5 mM c/u	1 µL
Biotools High Retrotranscriptasa	-	0,5 µL

4. Repartir 5 µL de la mezcla preparada y mantener en hielo.
5. Agregar 15 µL de la mezcla RNA/primer, para un volumen de 20 µL.
6. Dar spin.
7. Incubar a 47°C durante 30 minutos. Para Hexameros Ramdom, incubar a 25°C durante 10 minutos y a continuación 47°C durante 30 minutos.
8. Inactivar la retrotranscriptasa a 85°C durante 5 minutos. Poner en hielo.
9. Cuantificar en Nanodrop (Bionova).
10. Mantener los tubos a 4°C durante 1-2 horas o guardar a -20°C.

La cantidad de producto final a utilizar para RT-PCR o RT-qPCR debe ser optimizado. Por lo general se utilizarán entre 1 y 5 µL por reacción de amplificación.

7. 2 Amplificación y electroforesis de ácidos nucleicos.

7. 2. 1 Diseño y síntesis de primers o cebadores.

Para el diseño de primers o cebadores específicos se utilizaron programas informáticos (ver apartado 9. 1).

En general, para el diseño de primers se deben tomar en cuenta las siguientes recomendaciones:

1. Deben tener una longitud de entre 17-28 bases.
2. El contenido de G+C debe estar alrededor del 50-60%.
3. Deseables temperaturas de melting entre 5 y 80°C.
4. Se deben evitar secuencias de 3 o mas G o C en la región 3´.
5. Las terminaciones 3´no deben ser complementarias para evitar la formación de dímeros.
6. Deben evitarse la formación de secuencias auto-complementarias (estructuras secundarias).

Para el diseño de primers para PCR cuantitativa, se deben tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

1. Amplicón de entre 50 y 200 pb y debería contener mas de un exón. Si es para planta, debe situarse mas cerca del extremo 3´UTR.

2. Temperatura de melting (Tm) entre 58-60ºC.
3. Contenido en G+C entre 30-80%. Evitar 4 o mas Gs continuas.
4. También se recomiendan los pasos 4, 5 y 6.

Los primers utilizados en este trabajo (Tabla 12) fueron sintetizados por Sigma, Invitrogen y Eurofins. Todos los primers se conservaron a -20ºC a una concentración stock de 100 µM. Como concentración de trabajo se utilizó 10 µM, diluyendo y alicuotando los *stocks*.

Tabla 12. Primers utilizados en este trabajo.

Gen	Nombre	Secuencia (5´-3)	Referencia
celC (ANU843)	**CelCexF**	TCGCCGCCAACTGGCTGTC	Tesis Robledo, 2010
	C1F	ATCAGCCACAGCGAAGGGCA	Tesis Robledo, 2010
	C2R	CACAGACACTCCGGATGC	Tesis Robledo, 2010
celC (para Gateway)	**BPcelCF**	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAG CAGGCTTCGAAGAAGCTGGGCCG GTCGAAATGAGGCGGTGGCGCG CGCTT	Este trabajo
	BPcelCR	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAG CTGGGTTCAACACTCCGGATGCT TCTCCCCG	Este trabajo
RT-qPCR	**RIP1bisF**	GATGCAAGAACAGCAAGCAA	Este trabajo
	RIP1bisR	AGTGTGGCCACCAGAAAGAG	Este trabajo
	RPGbisF	GGCATGGAGAGTCCAAAGAG	Este trabajo
	RPGbisR	CCTCCGTCAATTCCTTCAAA	Este trabajo
	VAPF	GGGTTTAAATTGCTGTTACAATC	Murray *et al.*, 2011
	VAPR	AGCCAAAGACATCAGACAACC	Murray *et al.*, 2011
	Chr7F	GGCTCTGACCCAATACCAGA	Este trabajo
	Chr7R	TTCACGAAGGTGACCATCAA	Este trabajo
	PALF	TCTTTGGGGTTGATTTCTGC	Este trabajo
	PALR	TTTCCTCCAAATGCCTCAAG	Este trabajo
	EF1αF (**histone-3-like**)	CTTTGCTTGGTGCTGTTTAGATG G	Rey *et al.*, 2013
	EF1αR (**histone-3-like**)	ATTCCAAAGGCGGCTGCATA	Rey *et al.*, 2013
Fusión transcripcional	**SpeIFTF**	ACTAGTGTGGAACCGTGCCTC	Este trabajo
	XbaIFTR	TCTAGATGCAACCGCGACAGAGG	Este trabajo
celC (WSM419)	**EcoRIwsmF**	GAATTCGTACGCCGTGCTGCTCG TCTG	Este trabajo
	XbaIsmedwsmR	TCTAGACAAGCGCGGCGGTCACA AC	Este trabajo

7. 2. 2 Amplificación de ácidos nucleicos

7. 2. 2. 1 PCR convencional

Técnica empleada para la amplificación de DNAg y DNAp. Dependiendo del tipo de extracción de utilizó una *Taq* polimerasa u otra (apartados 7. 2. 2. 1. 1 y 7. 2. 2. 1. 2). El volumen final de las reacciones fue en la mayoría de ocasiones de 25 µL, pero si es necesario recuperar el DNA de banda, el volumen aumenta a 50 µL.

7. 2. 2. 1. 1 REDExtract Ready Master Mix (Sigma)

Para DNA extraído con el kit comercial REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit, realizamos el mix de reacción detallado en la tabla 13 y lo colocamos en un termociclador (MyCycler, BioRad), donde predefinimos el programa de PCR detallado en la tabla 14. Preparar tanto como sea necesario para el número de reacciones a realizar, incluyendo controles.

Tabla 13. Mix de reacción REDExtract Ready Master Mix

Reactivos	**Volumen 1X (20 µL)**
H_2O miliQ	8,5 µL
REDExtract Ready Mix	10 µL
Primer F (10 µM)	0,5 µL
Primer R (10 µM)	0,5 µL
DNA	0,5 µL

Tabla 14. Programa de PCR

Programa PCR		**Temperatura**	**Tiempo**
1 ciclo	Desnaturalización inicial	94ºC	5´
35 ciclos	Desnaturalización	94ºC	30´-1´
	Anillamiento	45ºC-68ºC	30´´-1
	Extensión	72ºC	1´-2
1 ciclo	Extensión final	72ºC	10´
"Hold"		4ºC	∝

La temperatura de anillamiento variará según el primer, al igual que el tiempo. El tiempo de extensión variará según el tamaño de banda esperada.

7. 2. 2. 1. 2 DreamTaq Green Master Mix (Thermo-Fischer)

Para DNA extraído con los otros métodos de extracción relatadas en los apartados 7. 1. 1. 1, 7. 1. 1. 2 y 7. 1. 1. 4, realizamos el mix de reacción

detallado en la tabla 15 y lo colocamos en un termociclador (MyCycler, BioRad), donde predefinimos el programa de PCR detallado en la tabla 16. Preparar tanto como sea necesario para el número de reacciones a realizar, incluyendo controles.

Tabla 15. Mix de reacción DreamTaq Green Master Mix

Reactivos	**Volumen 1X (25 µL)**
H_2O (Thermo-Fischer)	8,5 µL
DreamTaq Green Master Mix	12,5 µL
Primer F (10 µM)	1,5 µL
Primer R (10 µM)	1,5 µL
DNA	1 µL

Tabla 16. Programa de PCR

Programa PCR		**Temperatura**	**Tiempo**
1 ciclo	Desnaturalización inicial	95ºC	3-5´
35 ciclos	Desnaturalización	95ºC	30´-1´
	Anillamiento	45ºC-68ºC	30´´-1´
	Extensión	72ºC	1´-2´
1 ciclo	Extensión final	72ºC	7´
"Hold"		4ºC	∝

7. 2. 2. 2 PCR de colonia

Se utiliza como estrategia para una comprobación rápida de la presencia de insertos a partir de colonias crecidas en placa. Se trata de una PCR convencional en la que picamos una colonia con un palillo y la depositamos agitando dentro de los 25 µL de la mezcla de reacción.

7. 2. 2. 3 PCR en gradiente

Misma forma que una PCR convencional pero la finalidad consiste en realizar un gradiente de temperaturas en el bloque del termociclador que nos permita determinar cual es la temperatura de anillamiento óptima para los primers utilizados.

7. 2. 2. 4 RT-PCR (semicuantitativa)

Se trata de una PCR convencional en la que se utiliza DNA complementario como molde. Se utiliza el mismo procedimiento detallado en el apartado anterior, exceptuando el tiempo de extensión, que al amplificar

fragmentos de entre 50 a 200 pb se ve acortado (15-30 segundos). Los ciclos también se acortan entre 15 y 25 ciclos.

7. 2. 2. 5 PCR (qPCR) cuantitativa o a tiempo real.

La PCR en Tiempo Real es, básicamente, una PCR convencional en la que los equipos de amplificación (termocicladores) llevan incorporados un sistema de detección de fluorescencia (fluorímetro), basándose la tecnología en la utilización de fluoróforos. Esto nos va a permitir monitorizar, en tiempo real, lo que esta ocurriendo dentro de cada tubo en cada ciclo de amplificación y va a sustituir a los pasos de amplificación, electroforesis y análisis de imagen de una PCR tradicional.

Se utilizó el mix comercial Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies) y el aparato de PCR cuantitativa ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Life Technologies). La mezcla de reacción y el programa seguido se detalla a continuación (tablas 17 y 18)

Tabla 17. Mezcla de reacción qPCR

Reactivos	**Volumen 1X (25 µL)**
H_2O (Thermo-Fischer)	Hasta 25 µL
Power SYBR Green Master Mix 2X	12,5 µL
Primer F (5 µM)	0,5 µL
Primer R (5 µM)	0,5 µL
DNA_c	Variable*

Tabla 18. Programa de qPCR.

Programa PCR		**Temperatura**	**Tiempo**
1 ciclo	Hold	50ºC	2´
1 ciclo	Activación	95ºC	10´
	Anillamiento	55ºC	20´´
40 ciclos	Extensión	72ºC	15´´
Hold		4ºC	∞

*Exportar resultados a una hoja Excel y analizarlos medicante el método comparativo ΔCt (Livak and Schmittgem, 2001). Para confirmar, correr en un gel de agarosa alguno de los productos de la placa.

7. 2. 3 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1% (el porcentaje depende del tamaño de los fragmentos). El tampón utilizado para la preparación de los geles, así como

para la electroforesis fue TAE 1X (Millipore). Los moldes, cubetas y funetes de eletroforesis son de la casa comercial BioRad.

1. Preparar gel de agarosa a la concentración adecuada en TAE 1X. Disolver por calentamiento.*No hervir.
2. Añadir bromuro de etidio (Promega) a una concentración final de 0,5 µg/mL. Dejar solidificar en el molde apropiado. Colocar peine adecuado antes de solidificar.
3. Mezclar muestras con tampón de carga de electroforesis (Fermentas) en proporción 5:1. Depositar 20 µL por pocillo (en general).
4. Incluir marcador molecular de la gama GeneRuler (Fermentas). En este caso se utilizaron marcadores moleculares de 1kb y/o 100bp (ver figura 24).
5. Aplicar un voltaje de 90V durante 45 minutos con una fuente de alimentación (BioRad).
6. Tomar foto de los geles en un transiluminador (GelDoc, BioRad).

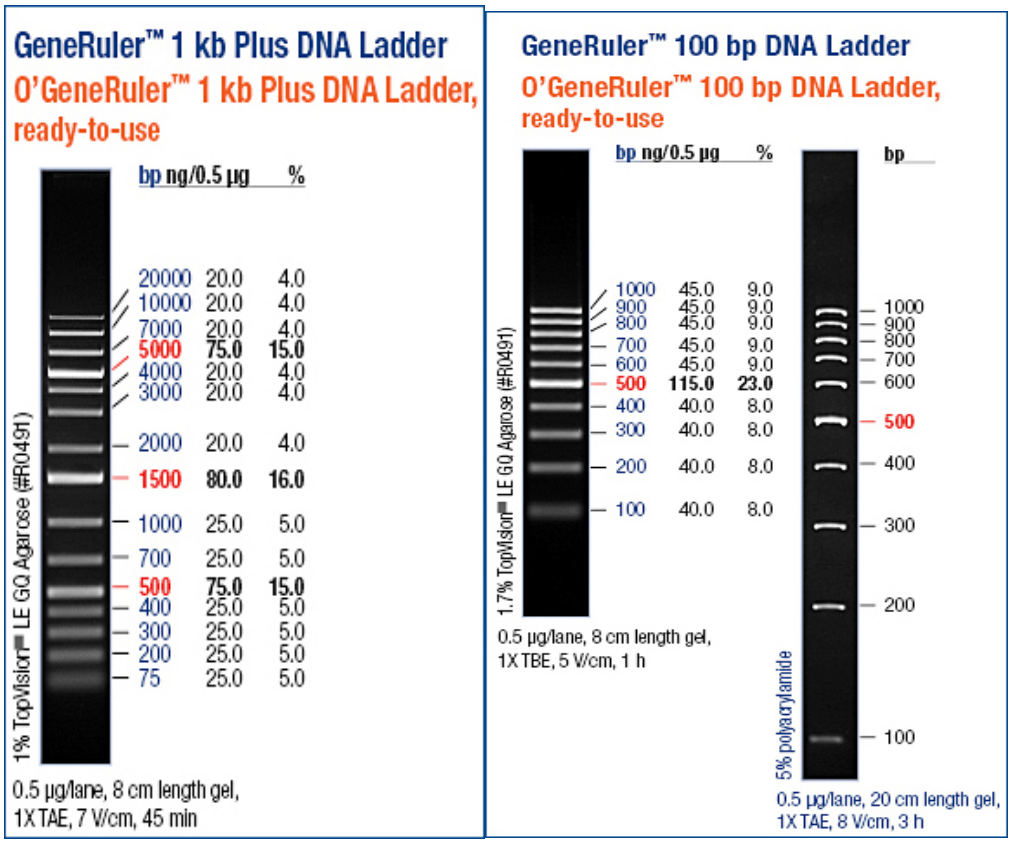


Figura 24. Marcadores moleculares utilizados en electroforesis en geles de agarosa. Casa comercial Fermentas (Thermo-Fischer).

Eventualmente, se tiñeron los geles en un baño de bromuro de etidio (Promega) a una concentración final de 0,5µg/ml durante 20 minutos y se retiró el exceso de bromuro 30 minutos en agua (clarifica las bandas).

7. 2. 4 Recuperación de fragmentos a partir de geles de agarosa.

Para ello se utilizó principalmente el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega), según las instrucciones del fabricante con alguna modificación, como se detalla a continuación.

Antes de comenzar, añadir la cantidad indicada de etanol 95% (Merck) a la Membrane Wash Solution.

1. Cortar bandas de interés con un bisturí limpio y depositar en tubos. Pesar.
2. Añadir 10 µL de *Membrane Binding Solution* por cada 10 mg de la banda en agarosa. Vortear.
3. Incubar a 50-65ºC durante 10 minutos o hasta que la banda se haya disuelto. Mezclar tubo varias veces durante la incubación.
4. Transferir a una *SV Minicolumn* e incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 14000 rpm 1 minuto. Descartar filtrado.
6. Lavar con 700 µL de *Membrane Wash Solution* y centrifugar a 14000 rpm 1 minuto. Descartar filtrado.
7. Repetir paso con 500 µL *Membrane Wash Solution* y centrifugar a 14000 rpm 5 minutos. Descartar filtrado.
8. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto con la tapa abierta.
9. Poner la columna en un tubo de 1,5 mL y añadir 30 µL de agua libre de nucleasas al centro de la columna.
10. Incubar un minuto y centrifugar a 14000 rpm 1 minuto.
11. Guardar el eluido a -20ºC hasta su uso.

7. 2. 5 Secuenciación

Para secuenciar, se enviaron las muestras al Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca de la siguente manera: 5,5 µl de la solución de ADN purificada de gel (aproximadamente 100 ng de ADN) y 2,5 µl del primer correspondiente (2 µM).

7. 3 Clonaje de fragmentos de interés.

7. 3. 1 Plásmidos y vectores de clonaje

En este trabajo se utilizaron técnicas de clonación tanto clásica (apartado 7. 3. 2) como mediante Gateway (apartado 7. 3. 3) que envuelven el uso de plásmidos y vectores de clonaje. Estos plásmidos y vectores contienen un gen de resistencia a un antibiótico y un lugar de múltiple clonaje ("multi-cloning site, MCS) en el que cortan las enzimas de restricción. Este MCS está localizado dentro del operón *lacZ*, lo que permite la identificación de colonias portadoras del inserto.

El vector de clonaje utilizado ha sido el vector comercial pGEM-t Easy (Promega, figura 25). Tiene un gen de resistenca a ampicilina como marcador y una deoxy-timina 3´ terminal en ambos extremos, lo que mejora la eficiencia de clonación de productos de PCR.

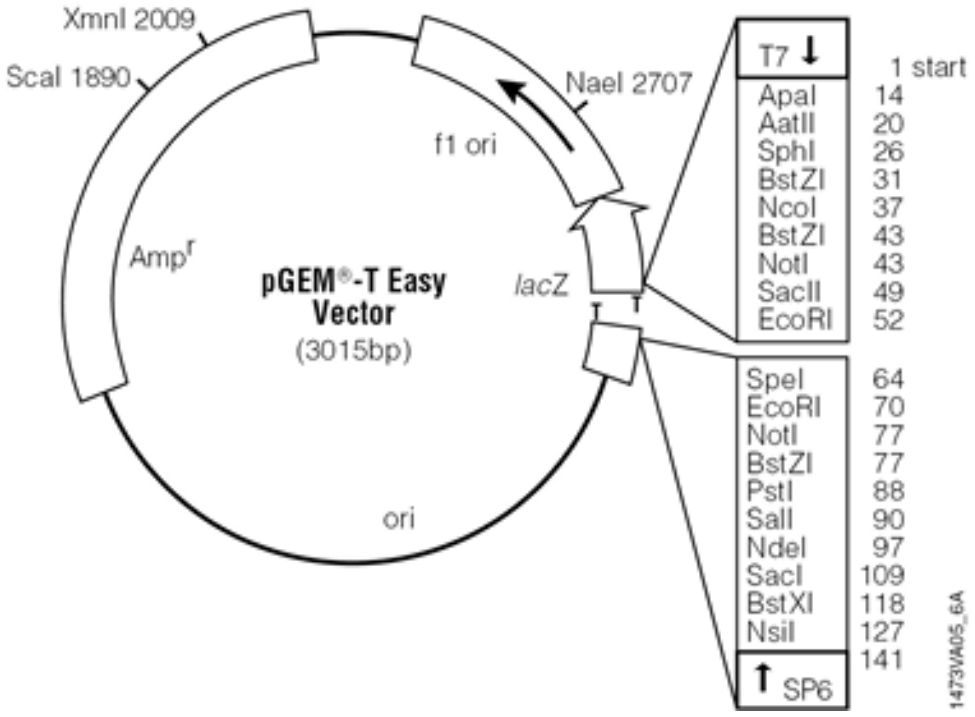


Figura 25. Vector de clonaje pGEM-t Easy (Promega). Se detalla el MCS, donde cortan las principales enzimas de restricción.

Los plásmidos utilizados para la clonación de fragmentos de DNA y obtención de los transformantes que se presentan en este trabajo se detallan a continuación.

El plásmido pBBR1-MCS-2 (Kovach *et al*., 1994) es un plásmido "*mid-copy number*", de amplio rango de hospedador y estable en *rhizobia* (figura 26). Pertenece a una serie de plásmidos con distintas resistencias a antibióticos que derivan del pBBR1-MCS. En particular, éste tiene resistencia a Kanamicina. Fue facilitado por la Dra. Clarisse Brígido de la Universidad de Évora (Portugal).

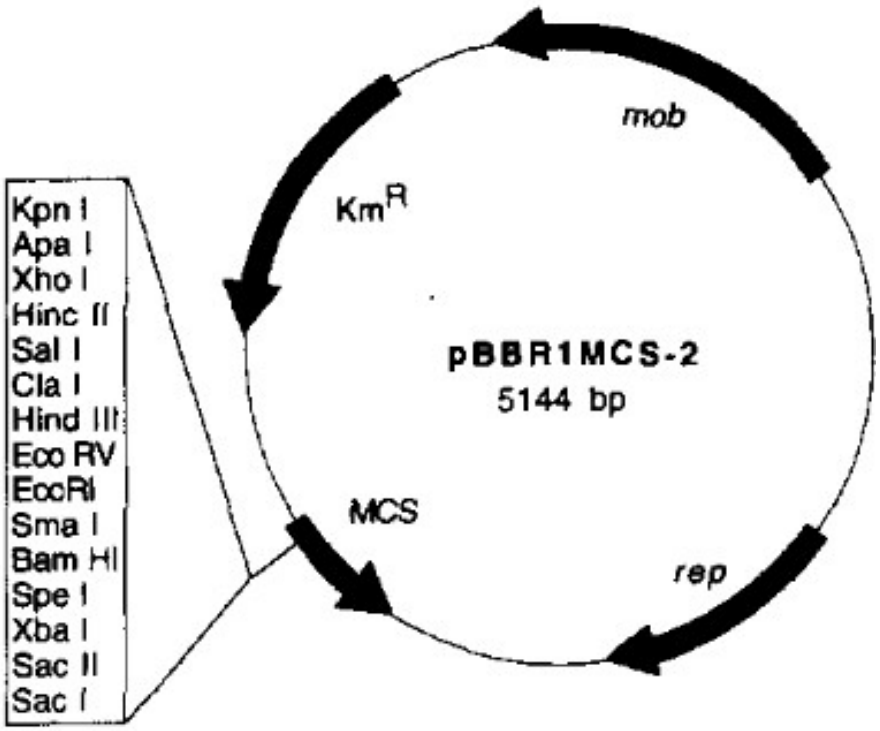


Figura 26. Plásmido pBBR1-MCS-2 (Kovach *et al*., 1994). Se detalla el MCS, donde cortan las principales enzimas de restricción.

El plásmido pk7WG2D.1 (figura 27), descrito por Karimi *et al*., (2002) se utilizó como vector de destino para clonar el gen *celC* por Gateway. Es un plásmido para transformación de plantas. El gen de interés entrará por recombinación en el lugar del gen *ccdB*. Contiene genes de resistencia a Kanamicina y a Estreptomicina / Espectinomicina. Fue cedido por el Department of Cell and Development Biology del John Innes Centre (JIC), Norwich, UK.

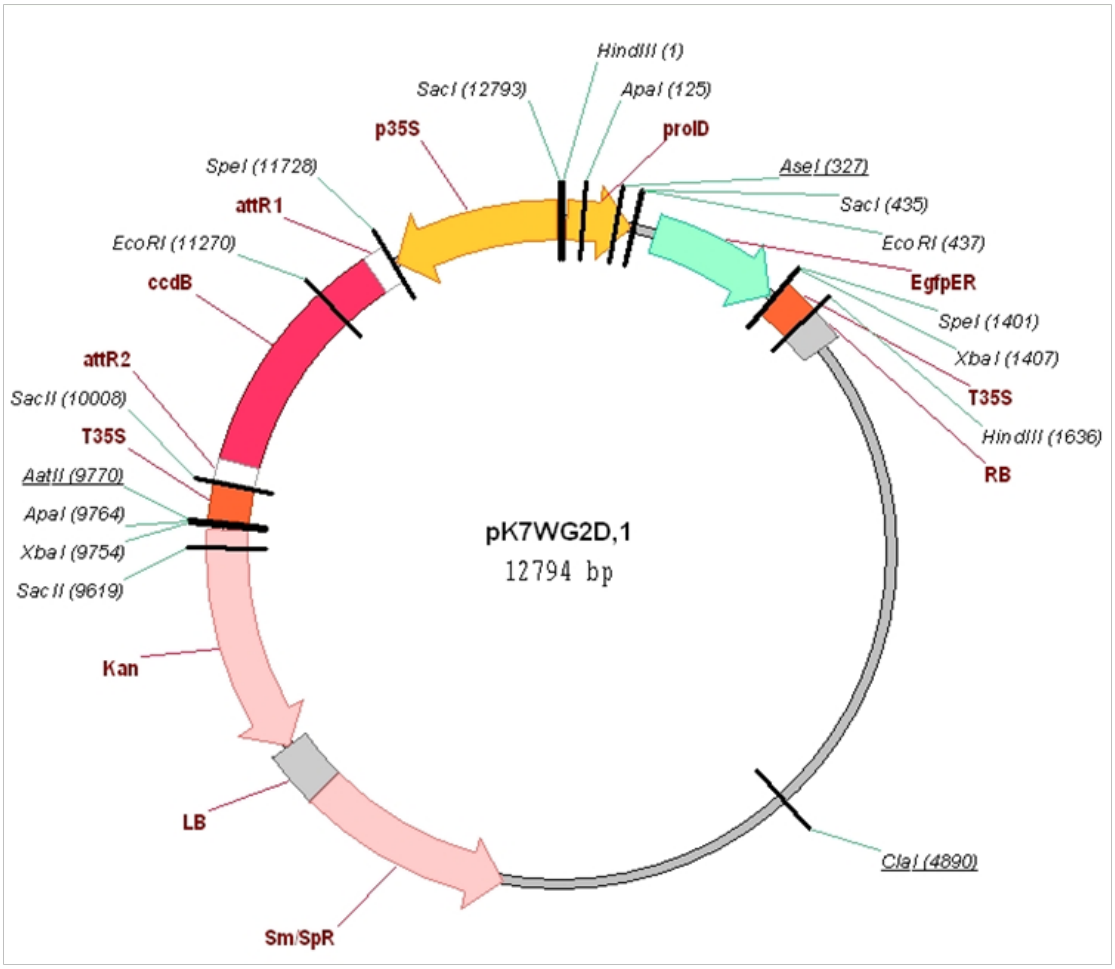


Figura 27. Plásmido pk7WG2D.1 (Karimi *et al*., 2002) para recombinaciones Gateway.

El resto de plásmidos y contrucciones derivadas se detallan a continuación (tabla 19).

Tabla 19. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características	Referencia
pHC60	Derivado de pHC41. Expresa constitutivamente una *gfp*. Tc^R	Cheng y Walker, 1998
pGUS3	Derivado de pBI101 (Clontech). Contiene FT *nfe::gusA*. Km^R	García-Rodríguez y Toro, 2000
pRK2013	Plásmido movilizador con replicón ColE1 y genes *tra* y *mob*. Km^R	Figurski y Helinski, 1979
pRK600	Derivado de pRK2013 con FT *Nm::Tn9*. Cm^R	Finan *et al*., 1985
pGpcelCXbaSpe	Fragmento de *celB-celC* (731pb) clonado entre los sitios SpeI y XbaI en pGEM-T Easy. Amp^R	Este trabajo
pBBFTGFP	Derivado de pBBR1-MCS-2. Contiene *gfp* para fusiones transcripcionales y sin promotor, Km^R	Este trabajo
pBB*pcelC*GFP	Fragmento de *celB-celC* (731pb) clonado entre los sitios SpeI y XbaI en pBBFTGFP.Km^R	Este trabajo
pXLGD4	Contiene *lacZ*. Tc^R	Leong *et al*., 1985
pPMC2	Fragmento de *celC* amplificado con CelCexF y C2R clonado en pGEM-T Easy. Amp^R	Robledo *et al*, 2008
pJZC2	*celC* insertado entre los sitios XhoI y SalI de pBBR1-MCS-2. Km^R	Robledo *et al*., 2011
pBHR-mRFP	Derivado de pHC60, reemplazando de GFP-S65T por mRFP. Tc^R	Smit *et al*, 2005
pGcelCSmed	Fragmento homólogo *celC* en WSM419 en pGEM-T Easy. Amp^R	Este trabajo
pEMC$^+$	Fragmento homólogo *celC* en WSM419 insertado entre los sitios EcoRI y XbaI de pBBR1-MCS-2. Km^R	Este trabajo
pKEV	Plásmido pk7WG2D.1 para recombinaciones Gateway. $Spec/Strep^R$	Karimi *et al*., 2002
pKcelC	Plásmido pk7WG2D.1 con inserto *celC*. $Spec/Strep^R$	Este trabajo.

7. 3. 2 Clonaje por restricción clásica

7. 3. 2. 1 Digestión con enzimas de restricción.

Se digirieron inserto y vector con las enzimas de restricción apropiadas. Todas las enzimas de restricción utilizadas son de la gama Fast Digest de Fermentas (Thermo-Fischer) y fueron utilizadas según las instrucciones del fabricante.

1. Preparar una mezcla de reacción como se detalla en la tabla 20.

Tabla 20. Mezcla de reacción de enzimas de restricción

Componente	**Volumen**		
	DNAp	**Producto PCR**	**DNAg**
Agua libre nucleasas	15 µl	17 µl	30 µl
10X FastDigest® buffer or 10X FastDigest® Green buffer	2 µl	2 µl	5 µl
DNA	2 µl (1 µg)	10 µl (~0.2 µg)	10 µl (5 µg)
Enzima FastDigest®	1 µl	1 µl	5 µl
Volumen total	20 µl	30 µl	50 µl

2. Mezclar suavemente y dar un spin.
3. Incubar a 37ºC en termoblock durante 5 minutos.
4. Inactivar enzima (opcional, ver instrucciones específicas).

En el caso de DNAp, comprobar mediante electroforesis que está completamente linealizado.

7. 3. 2. 2 Tratamiento de extremos

Se realiza un tratamiento con fosfatasa alcalina (TSAP, Promega) para mantener los extremos del vector listos para pegar con el inserto.

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción (Tabla 21).

Tabla 21. Mezcla de reacción TSAP

Reactivos	**Cantidad**
DNAp	1 µg
TSAP (Promega)	1 µL
Multi Core 10X Buffer	3 µL
SDW	Hasta 30 µL

2. Incubar 15 minutos a 37ºC.
3. Inactivar a 74ºC durante otros 15 minutos.

7. 3. 2. 3 Ligación de vector e inserto

Para ello, se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (Thermo-Fischer) que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre extremos yuxtapuestos 5´-P y 3´-OH en DNA de doble cadena o RNA.

1. Preparación de la reacción de ligación (tabla 22).

Tabla 22. Reacción de ligación T4 DNA ligasa ("*sticky end ligation*")

Reactivos	**Volumen (20 µL)**
Vector lineal	20-100 ng
Inserto	5:1 Inserto:vector
10X T4 DNA Ligasa Buffer	2 µL
T4 DNA Ligasa	1 µL (1 U)
Agua libre de nucleasas	Hasta 20 µL

2. Incubar de 10 minutos a una hora a 22ºC. Alternativamente incubar *overnight* a 4ºC.
3. Seguir con la transformación de *E. coli* (apartado 7. 4. 2).

7. 3. 3 Clonaje Gateway ® (Invitrogen).

Esta técnica fue realizada en las instalaciones del John Innes Centre (JIC), Norwich, UK. Se siguió el protocolo que recomienda el fabricante, que se expone brevemente a continuación.

1. Clonar gen *celC* en el vector donador pDONR207 por reacciones de recombinación BP, utilizando los primers BPcelCf y BPcelCR.
2. Comprobar por secuenciación.
3. Realizar reacción de recombinación en el vector de destino apropiado (pk7WG2D.1) por reacciones LR.
4. Seguir con la transformación de *R. rhizogenes* (apartado 7. 4. 3).

7. 4 Transformación de bacterias

7. 4. 1 Preparación *E. coli* competentes.

Según el protocolo descrito en Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al*., 1989). Las células que haremos competentes son de la cepa DH5α.

1. Picar una colonia de un cultivo fresco ("*overnight*" 37ºC) y ponerla en 100 mL de LB líquido.
2. Incubar 3 horas a 37ºC y 250 rpm, monitorizando cada cierto tiempo, hasta que el cultivo alcance una DO_{600} de 0,35 - 0,4.
3. Transferir las bcterias a tubos Falcon fríos. Mantener los cultivos en un baño de hielo a 0ºC durante 10 minutos.
4. Centrifugar a 4100 rpm 10 minutos a 4ºC. Descartar sobrenadante.
5. Secar tubos por inversión en un papel de filtro para eliminar trazas de medio.
6. Resuspender pellet en 2 mL de 0,1M $CaCl_2$ de cada 50 mL de cultivo original.
7. Realizar alícuotas de 100 µL y guardar a -80ºC hasta su uso.

7. 4. 2 Transformación *E. coli* por choque térmico.

Para la transformación de *E. coli* por choque térmico se siguió el método descrito por Sambrook *et al.*, (1989)

1. Mantener una alícuota de 100 µL de células competentes en hielo durante 10 minutos.
2. Llevar el producto de ligación a 40 µL con SDW y añadirlo a las células suavemente. Invertir tubo levemente.
3. Mantener los tubos en hielo durante 20 minutos.
4. Dar choque térmico a 42 ºC y 90 segundos en termoblock. Sin agitar, llevarlos a hielo durante 2 minutos.
5. Añadir 800 µL de LB e incubar a 37ºC y 50 rpm durante 45 minutos.
6. Preparar placas de LB+AB correspondiente (x4). Si los transformantes contienen operón *lacZ*, se añade XGal al 2% (40 µL por placa y se extiende).
7. Plaquear 100 µL de la suspensión de transformantes por duplicado.
8. Centrifugar brevemente el resto y descartar unos 400 µL, resuspendiendo el pellet en el resto. Volver a plaquear 100 µL por duplicado (con esto nos aseguramos que crezcan colonias si la eficiencia ha sido baja).
9. Incubar a 37ºC durante la noche.
10. Seleccionar colonias blancas y realizar una PCR en colonia (apartado 7. 2. 2. 2).
11. Resembrar y guardar las colonias positivas.

7. 4. 3 Preparación de células competentes y transformación *Rhizobium (Agrobacterium) rhizogenes* por "freeze-thaw".

Para la preparación de células competentes y transformación de *Agrobacterium* se siguió el método descrito por Hofgen y Willmitzer (1988).

Preparación de células competentes de *Agrobacterium:*

1. Preparar células competentes a partir de un cultivo *overnight* en TY. Diluir en 200 mL.
2. Incubar 3-4 h a 28ºC y 180 rpm y centrifugar a 3000g durante 20 minutos a 4ºC.
3. Lavar pellet en 10 mL de TE frío y resuspender en 20 mL de medio fresco.
4. Alicuotar y guardar a -80ºC hasta su uso.

Transformación de *Agrobacterium*:

1. Mantener células en hielo durante 20 minutos.
2. Añadir 0,5-1.0 µg del plásmido de interés.
3. Incubar en hielo 5 minutos, en Nitrogeno líquido 5 minutos y 5 minutos mas a 37ºC.
4. Diluir en 1 mL de medio TY fresco y mantener en agitación durante 2-4 horas a 28ºC.
5. Plaquear 200 µL en placas con los antibióticos correspondientes e incubar a 28ºC 1-2 días.
6. Seleccionar colonias y realizar comprobaciones pertinentes.

7. 4. 4 Transformación bi-triparental de *Ensifer*

La transferencia de los plásmidos utilizados durante este estudio a cepas de *Ensifer meliloti y Ensifer medicae* se realizó mediante una conjugación biparental o triparental, según las características de la cepa donadora. En el caso de la transformación triparental es necesaria una cepa "*helper*".

1. Resembrar las cepas donadora (*E. coli* DH5α con plásmido de interés), la cepa "*helper*" (*E. coli* DH5α con pRK2013/pRK600) y la cepa receptora (*Ensifer*) en medio sólido de manera que el día de la transformación estén frescas (2 días para *Ensifer*, *overnight E. coli*).
2. Mezclar con ayuda de un asa de siembra estéril una proporción 2:1:1 (R:H:D) en una placa de medio TY.
3. Incubar a 28 ºC durante toda la noche.
4. Sembrar por agotamiento en estría en Medio Mínimo sólido para *Rhizobium* (O'Gara y Shanmugam, 1976) modificado y suplementado con el antibiótico selectivo correspondiente.
5. Incubar a 28 ºC hasta aparición de colonias aisladas.
6. Seleccionar y sembrar simultáneamente en medio mínimo sólido suplementado con el antibiótico correspondiente y en medio sólido VRB que se incubó a 37 ºC.
7. Seleccionar los transconjugantes negativos para crecimiento en VRB a las 48 h.
8. Sembrar en su medio habitual suplementado con el antibiótico correspondiente.
9. Comprobar mediante PCR/fluorescencia/otros y guardar en glicerol.

*No olvidar controles de transformación.

En el caso de una transformación biparental, el procedimiento es igual con la diferencia de que la cepa donadora tiene capacidad movilizadora, por lo que no es necesaria la adición a la mezcla de una cepa "*helper*".

8. Técnicas histológicas y microscópicas.

8. 1 Cortes histológicos de nódulos. Azul de toluidina.

El protocolo de tinción con azul de toluidina fué realizado en el Servicio de Patología Diagnóstica / Banco de Tumores del Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca:

1. Procesar los nódulos fijados en formaldehído 4% durante 18 24 horas y embeberlos en un bloque de parafina* (procesador Tissue- Tek TEC de Sakura®). En un primer lugar, se sumerge la muestra en formol durante 30 minutos. Inmediatamente después, la muestra se somete a una serie creciente de alcoholes-xiloles de una hora de duración cada pase. Posteriormente se embeben en parafina, cambiándola cada hora y 20 minutos.
2. Realizar cortes de 2 - 3 micras en el microtomo. Introducir los cortes en la estufa a 60ºC.
3. Desparafinar los cortes con una serie decreciente de xiloles-alcoholes-H_2O.
4. Añadir la solución de azul de toluidina (0,01% de Azul de Toluidina en H_2O destilada) hasta cubrir toda la muestra durante 30 segundos a 1 minuto.
5. Retirar el colorante.
6. Lavar con H_2O destilada.
7. Introducir los portas en una serie creciente Alcohol-Xilol 1:1.
8. Aclarar en Xilol (3 veces) y montar con DPX.

8. 2 Cortes histológicos de nódulos. Inmunohistoquímica.

Esta técnica se realizó a partir de nódulos fijados en Formaldehído (Sigma) al 4% durante al menos 24 horas utilizando el Servicio de Patología Diagnóstica/Banco de Tumores del Centro de Investigación del Cáncer (CIC), Universidad de Salamanca. Este protocolo fue facilitado por el personal responsable del servicio detallado a continuación.

1. Desparafinar e hidratación de las muestras

2. Desenmascaramiento del epítopo: PBS1X+Leche 2%+Tritón 0.3% 1h a temperatura ambiente.

3. Lavados con PBS1X+Triton 0.1%

4. Realizar lavados con PBS 1X (3 lavados de 10 minutos)

5. Incubación del Anticuerpo primario P2C2 (anticuerpo seleccionado para el Péptido 2) diluido 1:2000 (dilución determinada mediante ELISA indirecto) durante una noche a 4ºC.

6. Realizar lavados sucesivos con PBS 1X.

7. Incubación del Anticuerpo secundario anti-rabbitt Cy3 o Alexa Fluor

diluido 1:200 durante 45minutos a temperatura ambiente.

8. Realizar lavados sucesivos con PBS 1X
9. Adición de DAPI.
10. Montaje en porta con antifade.

8. 3 Tinción ß-Gal (fusión *lacZ*) en raíces de *Medicago*.

Descrito por Teeri y colaboradores (Teeri *et al.*, 1989) con algunas modificaciones:

1. Cortar raíces y fijar en glutaraldehído al 2,5% (Sigma) durante una hora.
2. Lavar 3 veces durante 5 minutos cada vez con tampón Z (ver tabla 23).

Tabla 23. Composición tampón Z.

Reactivos		**mL/L**
NaP 1 M pH 7	NaH_2PO_4 1M (Panreac)	39
	Na_2HPO_4 1M (Panreac)	61
KCl 1M (Panreac)		10
$MgSO_4$ 1M (Panreac)		1
Agua destilada		889

3. Incubar las raíces en solución X-Gal (tabla 24) a 28ºC en oscuridad durante 1 noche.

Tabla 24. Composición de la solución de X-Gal.

Reactivos	**µL/10 mL**
Tampón Z	8800
Ferrocianuro potásico 100mM (Panreac)	500
Ferricianuro potásico 100mM (Panreac)	500
X-Gal 4% en DMF(Thermo- Fischer)	200

4. Lavar 30 segundos con tampón Z. Descartar.
5. Lavar una hora con tampón Z.
6. Reponer tampón Z y añadir 2-3 gotas de Na-EDTA 0,5M, para su conservación.
7. Montaje y observación al microscopio óptico (apartados 8. 4 y 8. 5).

8. 4 Montaje de muestras para observación al microscopio.

Se realizó el montaje de muestras en fresco para su observación a los distintos tipos de microscopio disponibles.

1. Añadir una gota de agua destilada o, en su caso, ioduro de propidio 10µM (Sigma) sobre un porta limpio y seco.
2. Cortar raíz/nódulo a observar y colocarlo encima del porta.

3. Añadir un poco más de agua o ioduro y colocar el cubre, evitando la formación de burbujas.
4. Observar y fotografiar.

8. 5 Microscopía óptica

Se utilizó para visualizar colonización e infección temprana así como los cortes de nódulos en azul de toluidina. Se utilizó un microscopio óptico Leica FW400.

Para la visualización de nódulos enteros se utilizó una lupa estereoscópica (Nikon SMZ800).

8. 6 Microscopía de fluorescencia

Las bacterias marcadas con GFP y RFP se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 80i. También se utilizó para ver ensayos de colonización e infección con dichas bacterias fluorescentes a tiempos cortos de inoculación. Además se utilizó para la visualización y fotografía de los cortes inmunohistoquímicos.

Además, se utilizó una lupa estereoscópica de fluorescencia (Leica M Series) para el chequeo de raíces fluorescentes en los ensayos de transformación de raíces.

8. 7 Microscopía confocal

En nódulos enteros y cortes se confirmó la emisión de fluorescencia mediante microscopía confocal espectral con un microscopio TSL Leica SP2 (CIALE e INCyL) y en ocasiones un SP5 (CIC). En concreto, la proteína GFP se excitó a 488-nm mediante un láser de argón y un filtro de emisión de banda ancha centrado en unos 500 nm. Las proyecciones se llevaron a cabo tomando imágenes individuales cada 1-2 µm y ajustándolas con el software del sistema.

9. Tratamiento de datos.

9. 1 Herramientas bioinformáticas

El tratamiento de secuencias, visualización de plásmidos y diseño de primers se realizaron con los recursos contenidos en el software Geneious 4.8.4 (Biomatters).

Eventualmente se utilizaron los programas BioEdit 7.2.1 (Ibis Bioscience) y 4Peaks (Mekentosj).

Adicionalmente, para el diseño de primers se utilizó el programa Primer 3 (Untergrasser *et al.*, 2012).

Cuando fue necesario se recurrió a ExPASy (www.expasy.org), la plataforma de Recursos Bioinformáticos del SIB (Swiss Institute for Bioinformatics).

La comparación de secuencias para su comprobación se llevó a cabo gracias a la aplicación BLAST (Altschul *et al.*, 1990), del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

El estudio *in silico* de los dominios proteicos se realizó utilizando InterProScan de los servicios bioinformáticos del European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI).

Para el modelaje de las proteínas y generación de los modelos se utilizó Phyre2 (Kelley and Sternberg, 2009) del grupo de Biología Estructural del Imperial College, Londres, UK.

9. 2 Análisis estadísticos

Los datos numéricos y su procesamiento se realizó utilizando el programa Excel (Microsoft).

Para el tratamiento estadístico de los datos se realizó un análisis de la varianza y se calcularon las diferencias significativas mediante el test de Fischer (Steel y Torrie, 1980) utilizando el programa StatView 5 (Abacus Corporation).

9. 3 Visualización de imágenes.

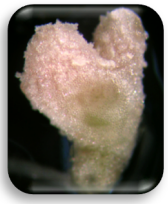
La visualización de ácidos nucleicos se realizó en un Gel Doc EZ System (BioRad) y su edición mediante el software Quantity One (BioRad).

El resto de imágenes se tomaron con una cámara Lumix de Nikon y fueron editadas con el programa Adobe Photoshop CS5 (Adobe).

Las imágenes tomadas en microscopía confocal fueron editadas y superpuestas con el software Leica LCS Suite.

9. 4 Bibliografía.

Para incluir las citaciones pertinentes en cada uno de los apartados se utilizó el gestor bibliográfico Papers2 (Mekentosj).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1

Análisis *in silico* del operón *celABC* e identificación de una posible secuencia reguladora de la expresión del gen *celC* en *Rhizobium.*

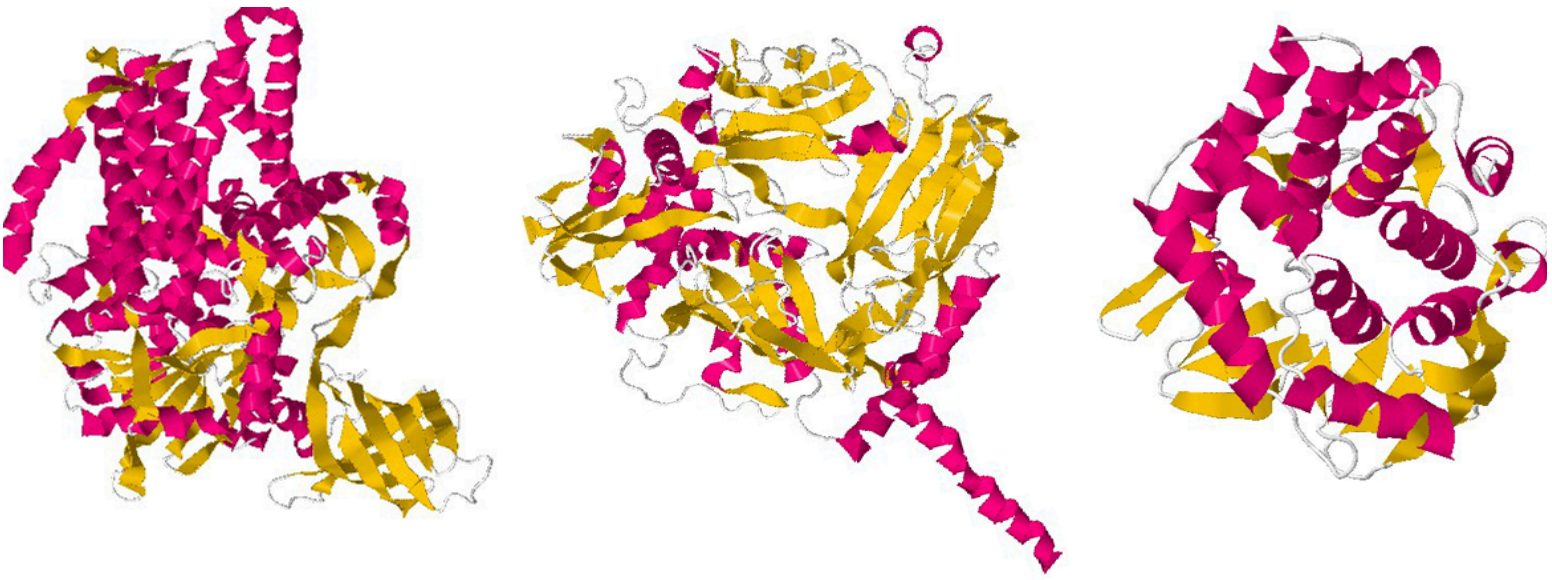


Imagen: Esquema de las estructuras de las proteínas CelA, CelB y CelC de *Rhizobium* realizado mediante el programa informático Phyre2.

1. Introducción

Las bacterias de los géneros *Rhizobium, Ensifer, Azorhizobium, Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium*, es decir, los comúnmente denominados rizobios, producen una gran variedad de polisacáridos y moléculas relacionadas con diferentes estructuras y funciones, muchas de ellas aún no conocidas, al igual que en muchos otros géneros de bacterias tanto patógenas como beneficiosas. Estos polisacáridos pueden ser solubles como los cicloglucanos, lipopolisacáridos (LPS), polisacáridos capsulares (KPS) y exopolisacáridos (EPS) (Davey y O´Toole, 2000) (ver apartado 6. 2 de la Introducción general).

De entre los polisacáridos insolubles, la celulosa parece jugar un papel importante en la adhesión a superficies, siendo una de las moléculas que intervienen en el proceso de formación de biofilms, ya que forma la matriz en la que están embebidas las bacterias (Robledo *et al*., 2012). En estudios anteriores se ha demostrado que, en cultivo puro, el endosimbionte *Rhizobium leguminosarum* es capaz de sintetizar microfibrillas de celulosa que intervienen en la colonización de la superficie de las raíces de *Trifolium repens*, su planta hospedadora (Mateos *et al*., 1995), además de caracterizar el papel de la celulosa en la formación y maduración de biofilms (Robledo *et al*., 2012).

Aún siendo una característica compartida en rizobios, la biosíntesis de celulosa bacteriana es un proceso muy complejo y altamente regulado que no se conoce aún en profundidad pero que comparte ciertas similitudes con la biosíntesis de celulosa en plantas, como en su estructura (Peng *et al*., 2002), aunque difieren en complejidad y en las propiedades fisico-químicas (Ross *et al*., 1991). La celulosa es un biopolímero que consiste en cadenas de ß-(1-4)-D-glucopiranosa, componente esencial de las paredes celulares vegetales. En bacterias, su biosíntesis ha sido estudiada en su mayoría en la bacteria modelo *Gluconacetobacter xylinum* (Wong *et al*., 1990), aunque también se ha estudiado en *E. coli, Agrobacterium* y *Rhizobium leguminosarum*, entre otras.

Los genes implicados en la síntesis de celulosa están próximos entre sí, localizados en una región cromosómica denominada operón *celABC* o *bcsABZ*. La regulación de esta ruta biosintética se lleva a cabo por el mensajero secundario di-GMP cíclico y por varias proteínas con dominios GGDEF (Romling, 2002). Diversos estudios en cepas de *Rhizobium leguminosarum* muestran que cepas defectivas en la producción de celulosa debido a mutaciones por inserción en los genes *celA* y *celB* son capaces de establecer simbiosis efectivas con su hospedador específico en condiciones de laboratorio por lo que en un principio, el defecto en la biosíntesis de celulosa no parece ser esencial para la infección y nodulación de las raíces de la planta hospedadora (Ausmees *et al*., 1999). Si bien, se ha demostrado en estudios recientes que la celulosa es esencial en la adhesión firme y en la formación de biofilms maduros (Robledo *et al*., 2012).

El análisis *in silico* de los genes que componen el operón *celABC* en *Rhizobium*, es imprescindible para entender sus mecanismos regulatorios y de expresión, ya que estos mecanismos no están completamente caracterizados en la actualidad.

2. Análisis *"in silico"* del operón *celABC* de *Rhizobium* y géneros relacionados.

En este apartado de la memoria de tesis doctoral, pretendemos realizar un análisis bioinformático sobre las secuencias ya conocidas de este operón. Para ahondar más en las funciones y en las posibles connotaciones de la posesión por parte de las bacterias estudiadas del operón *celABC*, comenzamos por realizar una búsqueda en las bases de datos, utilizando la base de datos del "*National Center for Biotechnology Information* (NCBI)" principalmente, utilizando las secuencias nucleotídicas, descritas por Robledo y colaboradores, de los genes *celA, celB* y *celC* de la cepa ANU843, además de sus secuencias aminoacídicas (Robledo *et al*., 2012; Robledo *et al*., 2008).

2.1 Análisis a nivel genómico

Utilizando la herramienta BLASTn (figura 28), se han identificado numerosas cepas de la especie *Rhizobium leguminosarum* que contienen homólogos al operón *celABC*, con altos porcentajes de similitud respecto de la cepa ANU843 (Robledo *et al*., 2011 b). Dentro del mismo género *Rhizobium* se identifican otras especies, por ejemplo *R. etli* o *R. tropici*, que también contienen secuencias con alto grado de similitud con dicho operón en ANU843. No obstante, en el caso de *R. leguminosarum* bv viciae 3841 el operón se conforma, además de los genes *celA*, *celB* y *celC*, de un cuarto gen *celD*, siendo la estructura similar al operón encontrado en los estudios realizados en *Bacillus subtilis* (Tobisch *et al*., 1997) y en *A. tumefaciens* C58 (Mathysse *et al*., 1995).

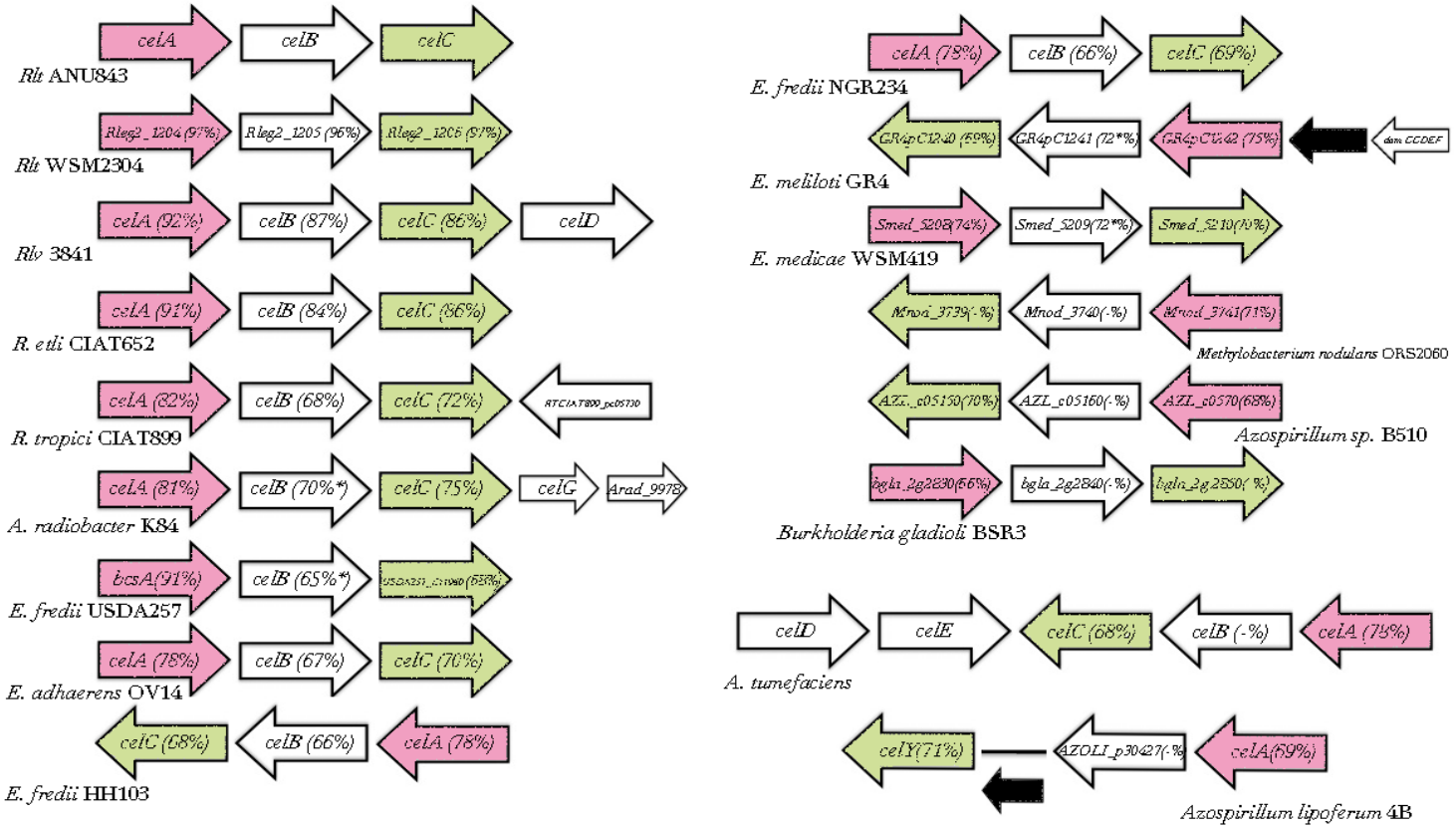


Figura 28. Esquema de las estructuras del operón *celABC* (BLASTn) encontradas en el género *Rhizobium* y géneros relacionados, bacterias fijadoras en vida libre y otros géneros de bacterias encontradas en nódulos de leguminosas. En verde se representan los similares a *celC* y en rosa los similares a *celA*. En negro se representan proteínas no anotadas aún pero que pueden tener una importancia especial.

El operón *celABC* existente en las especies de *Rhizobium* es muy similar a los encontrados en el género *Agrobacterium*, lo cual es razonable ya que el género *Agrobacterium* se ha reclasificado recientemente en *Rhizobium* (Young *et al*., 2001). Además encontramos un alto grado de similitud de secuencia con distintas especies del género *Ensifer*, como son *E. medicae, E. fredii, E. adhaerens* y *E. meliloti*, como veremos en el apartado 4 de este Capítulo. Los porcentajes de similitud en los genes *celA* y *celC* entre *Ensifer* y *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843 son relativamente altos, estando entre un 91 y un 74% para el gen *celA* y entre un 70 y un 68% para el gen *celC*. En cuanto al gen *celB*, las similitudes que se encuentran se reducen a una parte pequeña de la secuencia, no al total de la secuencia como cabría esperar, lo que hace que este gen sea muy variable entre géneros afines e incluso entre diferentes especies del mismo género.

Los análisis realizados también muestran un elevado grado de similitud con ciertas especies y/o cepas, ya secuenciado su genoma, pertenecientes a otros géneros de bacterias fijadoras en vida libre, como *Azospirillum sp*. B510 (Kaneko *et al*., 2010), *Azospirillum lipoferum* 4B, así como otras especies de bacterias que nodulan, *Methylobacterium nodulans* ORS2060 (Jourand *et al*., 2004) que nodula plantas del género *Crotalaria* y además, en otras especies de bacterias presentes en la rizosfera, como *Burkholderia gladioli* BSR3 (Yabuuchi *et al*., 1993). En algunas ocasiones el operón se encuentra en sentido inverso, como por ejemplo en *E. fredii* HH103, *E. meliloti* GR4, en las cepas de *Azospirillum* encontradas y en el propio *Agrobacterium tumefaciens* que a su vez tiene otro operón denominado *celDE*, en sentido contrario al operon *celABC*.

Curiosamente, en *Azospirillum lipoferum* 4B, encontramos un operón que tiene una elevada similitud de secuencia con los genes *celA* (69%) y *celC* (71%), siendo *celC* en este caso anotado como *celY* (celulasa Y). En cuanto al gen *celB*, no se encontró similitud en los análisis realizados, por lo que podríamos estar hablando de un gen totalmente diferente. Además, existe un cuarto gen anotado como "*hypothetical protein*" que se encuentra entre el gen AZOLI_p30427 y el gen *celY,* el cual codifica para una proteína de 92 aa sin función ni dominios proteicos conocidos. Se podría pensar que este operón no es comparable al operon *celABC*, pero si traducimos los genes a proteína y realizamos un estudio de dominios proteicos, vemos que estos dominios coinciden con los dominios de CelA, CelC e incluso CelB de *Rhizobium* y demás géneros relacionados, es decir, GTL 2_3/PilZ (PFAM13641/PFAM07238), GH8 (PFAM01270) y BcsB (PFAM03170), respectivamente.

Wisniewski-Dyé y colaboradores secuenciaron los genomas de *A. brasilense* Sp245 y *A. lipoferum* 4B, además de compararlos con el ya secuenciado con anterioridad *Azospirillum sp*. B510 (Kaneko *et al*., 2010), encontrando como característica interesante para la adaptación de estas bacterias desde el medio acuático al medio terrestre, la posesión de enzimas celulolíticas. Estos autores estudiaron la capacidad celulásica de estas tres

especies de *Azospirillum*, encontrando actividad en ellas, aunque con diferentes grados (Wisniewski-Dyé *et al*., 2011). Estos datos y la predicción de la existencia de proteínas con dominios glicosil hidrolasa, en especial GH8 en *A. lipoferum* 4B y *Azospirillum sp.* B510 pero no en *A. brasilense* Sp245 apoya nuestros datos y podemos incluir este operón entre los similares a *celABC* de *Rhizobium* y relacionados.

2. 2 Análisis a nivel proteómico e identificación y predicción de dominios.

Si traducimos a proteína las secuencias depositadas de la cepa ANU843 de *R. leguminosarum* bv trifolii y realizamos una predicción de dominios proteicos utilizando la herramienta Interproscan 5 (Jones *et al*., 2014) (Figura 29 A) podemos observar las características de las proteínas. Además, hemos realizado una modelización, utilizando la aplicación Phyre2 (Kelley and Stenberg, 2009), con el fin de predecir la estructura tridimensional de las tres proteinas codificadas por el operón *celABC* de *Rhizobium* (figura 29 B). La predicción realizada por Phyre2 se basa en la similitud de las estructuras con las estructuras depositadas en las bases de datos.

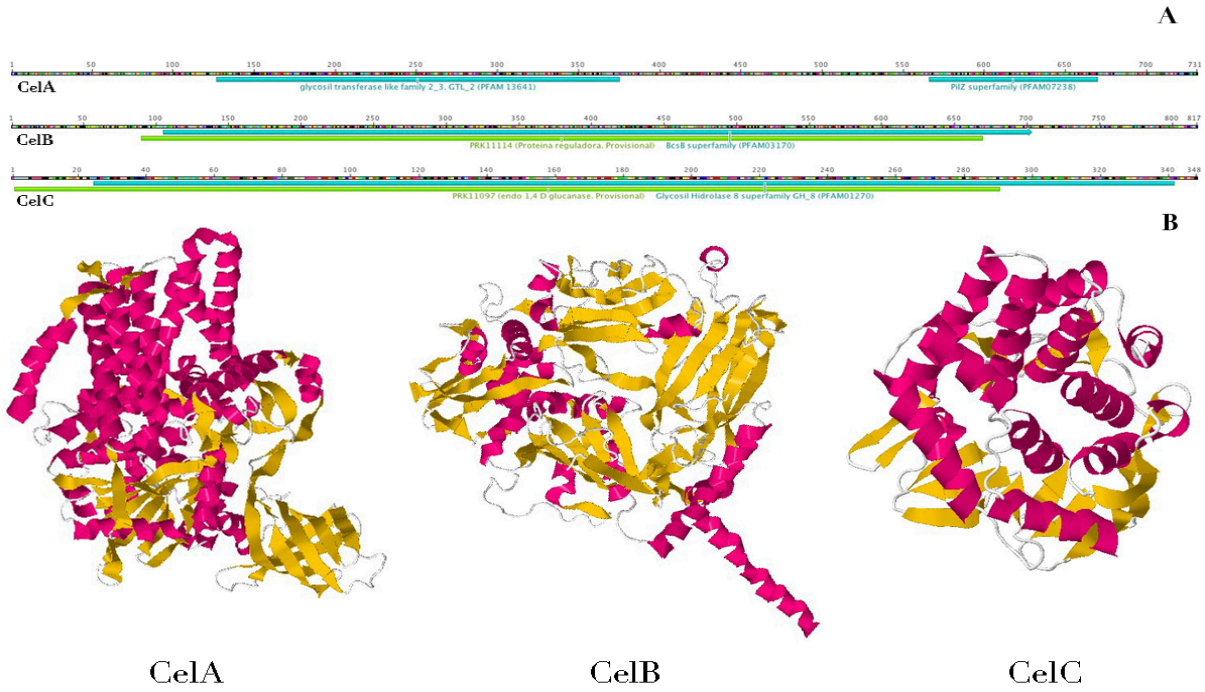


Figura 29. A) Proteínas codificadas por el operón *celABC* con las anotaciones correspondientes a la predicción de dominios proteicos realizados por la aplicación informática InterProScan 5. B) Estructuras tridimensionales predecidas para dichas proteínas realizadas por la aplicación bioinformática Phyre2. Esquemas representados utilizando el software Geneious 4. 8. 4.

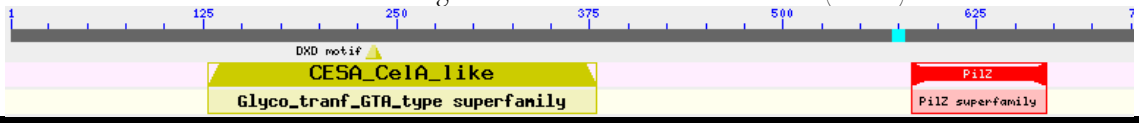
El gen *celA* codifica para una proteína de 731 aminoácidos correspondiente a una celulosa sintasa, denominada CelA, perteneciente a la familia 2 de las glicosil transferasas (PF13641) que está implicada en la biosíntesis de microfibrillas de celulosa bacteriana. Además, esta proteína

posee otro dominio proteico en éste caso de unión a di-GMP cíclico, denominado PilZ (PF07238), que resulta imprescindible para la regulación de la síntesis de celulosa.

Estudios anteriores sugieren que esta proteína está muy conservada, presentando una alta similitud con celulosa sintasas de *Rhizobium*, géneros afines e incluso de otros géneros (Robledo *et al*., 2012). Por ello realizamos una búsqueda en las bases de datos actualizadas de proteínas utilizando BLASTp, que confirma los estudios anteriores (tabla 25).

Tabla 25. Porcentaje de similitud y funciones anotadas de proteínas obtenidos enfrentando la secuencia aminoacídica de la celulosa sintasa CelA descrita en *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843 con la base de datos del NCBI, utilizando la herramienta BLASTp.

CelA *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii ANU843 (731aa)



Función descrita	Microorganismo	% Similitud
Subunidad catalítica celulosa sintasa (UDP-formadora)	*R. leguminosarum* bv. trifolii WSM2304	99%
Subunidad catalítica celulosa sintasa	*Rhizobium sp*. CCGE 510	98%
Subunidad catalítica celulosa sintasa (UDP-formadora)	*R. leguminosarum* bv. trifolii WSM2297	98%
Subunidad catalítica celulosa sintasa (UDP-formadora)	*R. leguminosarum* bv. viciae 3841	97%
Proteína celulosa sintasa	*R. etli* CNPAF512	96%
Subunidad catalítica celulosa sintasa (UDP-formadora)	*R. phaseoli*	96%
Celulosa sintasa (UDP-formadora) Proteína CelA-like	*R. etli* bv. mimosae Mim1	96%
Subunidad catalítica celulosa sintasa (UDP-formadora)	*R. mongolense*	90%
Subunidad catalítica celulosa sintasa	*R. grahamii*	90%
Celulosa sintasa	*Agrobacterium radiobacter* K84	85%
Subunidad catalítica celulosa sintasa	*Ensifer fredii* USDA 257	78%
Subunidad catalítica celulosa sintasa (UDP-formadora)	*E. fredii* NGR234	78%
Glicosil-transferasa, probablemente envuelta en la biogénesis de la pared celular	*E. meliloti* GR4	76%
Subunidad catalítica celulosa sintasa (UDP-formadora)	*E. adhaerens* OV14	77%
Celulosa sintasa	*E. medicae* WSM419	77%
Subunidad celulosa sintasa putativa	*E. fredii* HH103	79%
Subunidad catalítica celulosa sintasa (UDP-formadora)	*Microvirga lotononidis*	62%
Subunidad catalítica celulosa sintasa	*Methylobacterium nodulans* ORS 2060	50%

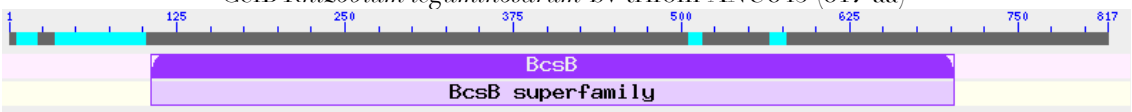
Además, los dominios que se predicen para estas proteínas con alto porcentaje de similitud son los mismos que se predicen para la celulosa sintasa de ANU843, es decir GTL_2 y PilZ.

Seguidamente, se analizó la proteína codificada por el gen *celB*. Esta proteína tiene una estructura primaria o secuencia aminoacídica de 817 aminoácidos. Aunque ésta proteína se anote como celulosa sintasa, lo cierto es que tiene una función desconocida, aunque recientemente se ha propuesto su función como proteína estructural (Morgan *et al.*, 2012). Se predice un dominio proteico de la familia BcsB "*bacterial cellulose synthase subunit B*" (PF03170), al igual que se predice una proteína reguladora PRK11114, aunque esta anotación es provisional.

En este caso, la proteína CelB no parece estar muy conservada entre géneros afines a *Rhizobium*, solamente se encuentra una similitud en un porcentaje alto y una cobertura de secuencia casi completa entre los miembros de *Rhizobium leguminosarum* y en algunas cepas de *R. etli* y *R. gallicum*. En el resto de especies, no hay una cobertura completa de la secuencia, siendo inexistente en la mayor parte de la secuencia (tabla 26).

Tabla 26. Porcentaje de similitud y funciones anotadas de proteínas obtenidos enfrentando la secuencia aminoacídica de la subunidad B de celulosa sintasa CelB descrita en *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843 con la base de datos del NCBI, utilizando la herramienta BLASTp

CelB *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii ANU843 (817 aa)

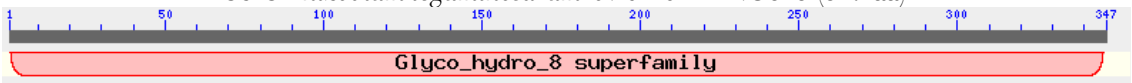


Función descrita	Microorganismo	% Similitud
Celulosa sintasa subunidad B	*R. leguminosarum* bv. trifolii WSM2304	98%
Proteína biogénesis citocromo C CcmF	*R. leguminosarum*	98%
Proteína biogénesis citocromo C CcmF	*R. leguminosarum* bv. trifolii CB782	93%
Celulosa sintasa subunidad B	*R. leguminosarum* bv. trifolii WSM1325	87%
Proteína biogénesis citocromo C CcmF	*R. gallicum*	88%
Proteína biogénesis citocromo C CcmF	*Rhizobium sp.* CCGE510	89%
Proteína biogénesis citocromo C CcmF	*R. leguminosarum* bv trifolii WSM1689	86%
Celulosa sintasa subunidad familia BcsB	*R. etli* bv. mimosae Mim1	85%
Celulosa sintasa	*R. etli* CFN42	85%
Celulosa sintasa	*R. leguminosarum* bv. viciae 3841	91%
Proteína CelB	*R. leguminosarum* (R200)	89%
Celulosa sintasa	*R. etli* CIAT 652	86%
Celulosa sintasa	*Agrobacterium radiobacter* K84	62%
Celulosa sintasa	*E. adhaerens* OV14	49%
Celulosa sintasa CelB	*E. fredii* USDA257	48%
Subunidad celulosa sintasa CelB	*E. fredii* HH103	48%
Celulosa sintasa	*E. fredii* NGR234	48%
Proteína biogénesis citocromo C CcmF	*Agrobacterium sp.* ATCC 31749	47%
Precursor proteína unión di-GMP cíclico	*A. tumefaciens* LBA4213 (Ach5)	48%
Celulosa sintasa subunidad B	*E. medicae* WSM419	45%
Subunidad de celulosa sintasa bacteriana	*E. meliloti* GR4]	45%
Subunidad celulosa sintasa bacteriana	*Microvirga lotononidis*	35%
Celulosa sintasa subunidad B	*Methylobacterium nodulans* ORS 2060	32%

Por último, el gen *celC* codifica para una celulasa o endo-1,4 ßD-glucanasa con un dominio perteneciente a la familia 8 de las glicosil hidrolasas (PF01270). Esta proteína de 347 aminoácidos está conservada en el género *Rhizobium* y, aunque la similitud sea menor en otros géneros como *Ensifer*, la funcionalidad y los dominios encontrados son idénticos (tabla 27).

Tabla 27. Porcentaje de similitud y funciones anotadas de proteínas obtenidos enfrentando la secuencia aminoacídica de la celulasa CelC descrita en *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843 con la base de datos del NCBI, utilizando la herramienta BLASTp.

CelC *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii ANU843 (347 aa)



Función descrita	Microorganismo	% Similitud
Celulasa	*R. leguminosarum* bv. trifolii WSM2304	99%
Endoglucanasa	*R. leguminosarum* bv. trifolii CB782	97%
Endoglucanasa	*R. leguminosarum*	96%
Endoglucanasa	*Rhizobium sp.* CCGE510	93%
Endoglucanasa	*R. leguminosarum*	89%
Endoglucanasa	*R. phaseoli*	89%
Endoglucanasa	*R. etli* CIAT 652	88%
Endoglucanasa	*R. etli* CNPAF512	88%
Endoglucanasa	*R. gallicum*	89%
Endoglucanasa	*R. leguminosarum* bv. trifolii WSM1689	89%
Endoglucanasa/Celulasa	*R. leguminosarum* bv. viciae 3841	88%
Celulasa	*R. leguminosarum* bv. trifolii WSM1325	78%
Endoglucanasa	*R. mongolense*	76%
Endoglucanasa (glicosil hidrolasa)	*A. radiobacter* K84	74%
Endoglucanasa (glicosil hidrolasa)	*R. grahamii*	73%
Endoglucanasa	*A. rhizogenes*	76%
Endoglucanasa	*E. fredii* USDA257	58%
Endoglucanasa	*E. fredii* NGR234	57%
Endoglucanasa putativa	*E. fredii* HH103	57%
Celulasa	*E. medicae* WSM419	58%
Endoglucanasa Y	*E. meliloti* GR4	58%
Precursor endoglucanasa	*E. adhaerens* OV14	59%

3. Identificación de una posible secuencia reguladora de la expresión del gen *celC* localizada en el gen *celB* de *Rhizobium leguminosarum*

La enorme variabilidad encontrada en los porcentajes de similitud de secuencia nucleotídica del gen *celB* y en su respectiva proteína, además de la limitada información que existe en la literatura sobre este gen, incrementa el interés de su estudio y, en particular, incrementa el interés sobre el papel que juega en la biosíntesis de celulosa así como en la interacción de estas bacterias con su hospedador.

Ausmees y colaboradores realizaron, mediante mutagénesis con Tn5, mutantes afectados en la biosíntesis de celulosa de *R. leguminosarum* bv trifolii R200. De entre los mutantes por inserción que obtuvieron, uno de ellos estaba

afectado en el gen *celA* (R204) y otro en *celB* (R211), produciendo el mismo fenotipo, es decir, ausencia de celulosa por ausencia de tinción con Rojo Congo (figura 30).

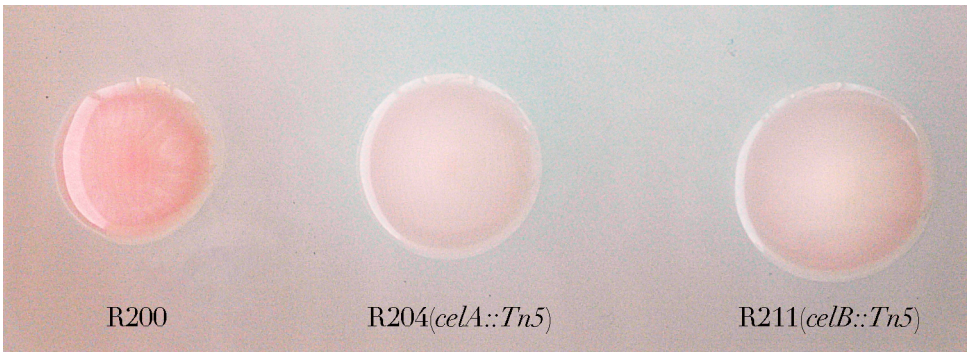


Figura 30. Producción de celulosa de los mutantes por inserción de *R. leguminosarum* bv. trifolii R200 descritos por Ausmees y colaboradores. La imagen muestra un defecto en producción de celulosa (colonias blanquecinas) en R204 y R211 respecto de la cepa silvestre R200.

Además, mediante esta técnica, identificaron genes reguladores de la biosíntesis de celulosa, como son el *celR1* y *celR2*. Aún así, en el trabajo publicado no se clarifica la posible función del *celB*, más allá de su possible implicación en la biosíntesis de celulosa.

En un estudio reciente (Robledo, Tesis Doctoral, 2010) se ha propuesto la possible existencia de una possible secuencia reguladora y/o promotora del gen *celC* contenida en el gen anterior, *celB*. Esta hipótesis se basa en la predicción mediante programas bioinformáticos (Solovyev y Salamov, 2011) de una caja -10 (TGGCGCAAT) y otra -35 (TTGCCT), apoyando la existencia de mecanismos de regulación interna de dicho gen. Si bien, en estudios de expresión realizados en el mismo trabajo, se observa una transcripción conjunta de los genes que conforman el denominado operón *celABC*, lo que es lógico pensar si hablamos de operón bacteriano (figura 31).

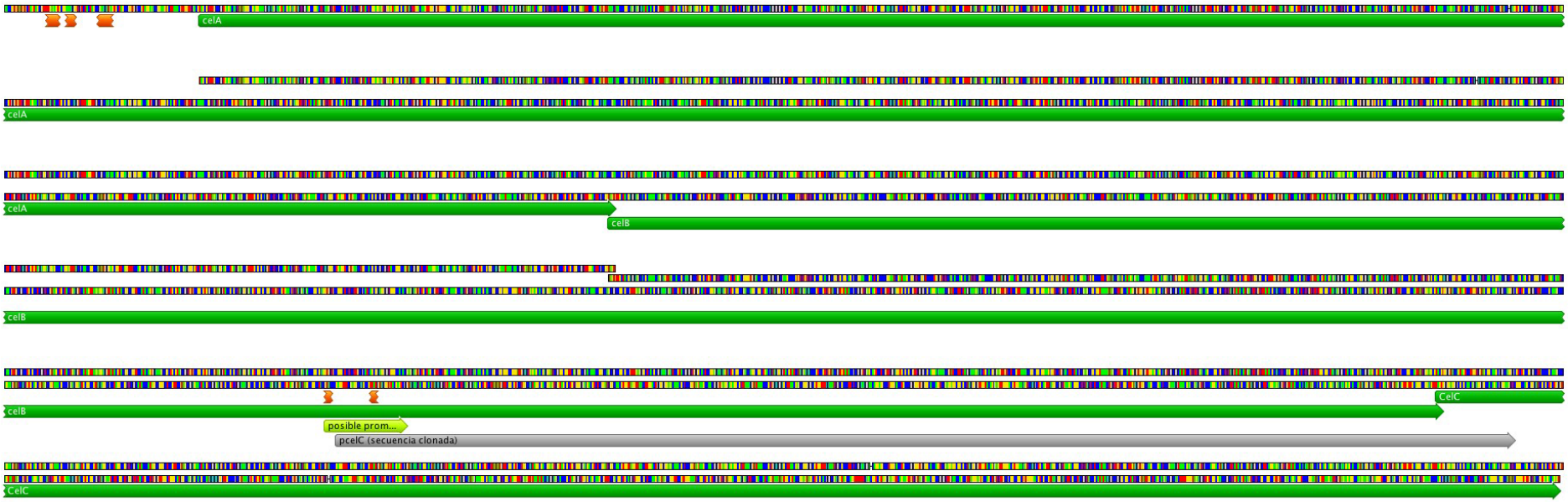


Figura 31. Estructura del operón *celABC* (en verde, los genes que lo componen). Se muestran las anotaciones correspondientes a los genes que lo componen, la secuencia de la caja por la que se predice el promotor del operón (naranja), el sitio de unión a factores de transcripción que se encuentra también "*upstream*" del gen *celA* y la secuencia clonada en la fusión transcripcional (gris) que se predice como potencial promotor y/o secuencia reguladora del gen *celC* (verde claro), además de las cajas por las que se predice este promotor/regulador (naranja, dentro del *pcelC*). Obtenido con Geneious 4.8.4. Predicciones de posibles promotores realizadas con BPROM de Softberry.

Tanto el fenotipo mostrado por el mutante R211 en los ensayos con Rojo Congo como la predicción de posibles secuencias promotoras, sugieren que el gen *celB* tiene una alta probabilidad de ejercer una función reguladora de la biosíntesis de celulosa, con lo cual, nos planteamos la posibilidad de obtener fusiones transcripcionales clonando el fragmento donde se predice una secuencia promotora/reguladora delante de un gen reportero, obteniendo así una señal de este gen donde se esté expresando esta construcción e induciendo el patrón de expresión del gen *downstream*, es decir, el gen *celC*, que siguiendo la polaridad del operón, podría verse afectado.

3. 1 Obtención de fusiones transcripcionales

Para la obtención de las fusiones transcripcionales que nos ayudarán a localizar el patrón de expresión de *celC* se utilizó un plásmido sin promotor preparado para fusiones transcripcionales. Este plásmido, denominado pBBFTGFP, deriva del plásmido pBBR1MCS-2 al que se le ha clonado en los sitios KpnI y SacI un fragmento proveniente del plásmido pHC125, que contiene una GFP y una secuencia estabilizadora (figura 32).

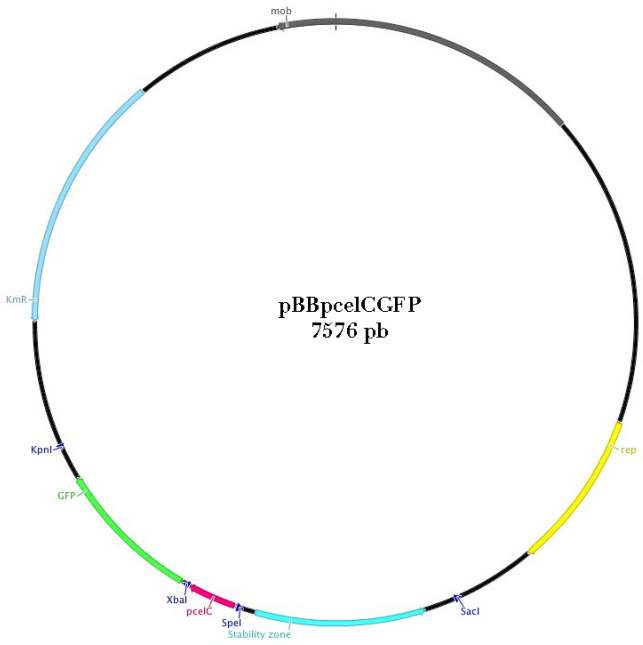


Figura 32. Esquema del plásmido pBBpcelCGFP. Se muestran los genes de resistencia a kanamicina (azul cielo), regiones *mob* (gris) y *rep* (amarillo) del plásmido pBBR1MCS-2 y la zona que contiene una GFP (verde) y una secuencia estabilizadora del plásmido pHC125 (azul neón) clonada en los sitios KpnI y SacI. Entre estas dos últimas zonas de la región obtenida del plásmido pHC125, se clonó el fragmento con la posible secuencia reguladora (*pcelC*) entre los sitios de restricción SpeI y XbaI (rosa).

El fragmento en el que se predice la secuencia reguladora (figura 33), denominada en un primer momento *pcelC*, se encuentra delante de la secuencia que codifica para una GFP, actuando de secuencia promotora ya que este plásmido carece de promotor. Este fragmento de 731 pb se sitúa en

su gran mayoría dentro del gen *celB*, aunque solapa con las 49 primeras pares de bases del gen *celC*.

GTGGAAACCGTGCCTCGCCGAATACGATCGGAGATCGTGACGCGATCTTCATCGGCTCGATCTCGCAGATGCCGACAACTGCGCTGTC
GCAGACCAATATAGCAACGGCGAGCCAGGCCTCATGGCGTCCGGTGACGGATGCGCAGACGGGCGTCGTCGACACCGGTACGGCCTTC
GAGGAATGGAATTCCAAGGTCAGCGGCGGTGTCTTTCGCACCCGGATGATTGCCTTCCGCGAGTGGCTGTGGCGCAATTTCGATATTT
CCCGCAGCTCGCTGCAATTCGTGCCGGGCGCCGAGGAAATCTTTACGCCGCCCAACACCGCTTCGCTTCTGGTGGCCCAGGGCTCCAG
CCCCGCGGGAGCGGGCTCCTGGACCGTGGTGGCGGCGCCATCGGCGAAGGATCTGCGTGAAGGGGTCGAGGTTCTGACCTCGCAGCTG
AACTGGCCGCAGTTGTCGGGCCACATCACCACCTATTCCAGCAAGACCGGCAAGATCGAGGCGTTGCCCGTCACCCGTTTCGATTTCG
TGCCGTCGACGCCCTGGTCGATCGCCAACTATCGCCTGATCGCCGCCAACTGGTTGTCGACGAATATCCTCTCTTATGCCTCGCTGCT
GGTCGTCTTCGTGCTCCTGATCGGCGTCACCACGTCGACGATGCTGAAGAAGCTGGGCCGGTCGAA<u>ATGAGGCGGTGGCGCGCGCTTC
TGCTGGCGG</u>CCTCTGTCGCGGTTGCAC

Figura 33. Secuencia nucleotídica del fragmento para el que se predice una secuencia reguladora clonado en el vector pBBFTGFP, derivado del pBBR1-MCS-2 que contiene un fragmento del plásmido pHC125 que codifica para una GFP. En negrita se resalta la secuencia correspondiente al gen *celB* y subrayados están los 49 nucleótidos iniciales de *celC*; en rojo y en verde se resaltan los primers *forward* y *reverse* utilizados para esta amplificación y que contienen sitios de corte SpeI y XbaI, respectivamente.

Esta construcción se transfirió por conjugación triparental a la cepa ANU843. Una vez obtenido el transformante de la cepa ANU843 que contiene el vector con la fusión transcripcional *pcelC::GFP* así como la que contiene el vector vacío como control (pBBFTGFP), realizamos sendas extensiones sobre un portaobjetos excabado con el fin de observar el cultivo puro utilizando el microscopio de fluorescencia (figura 34).

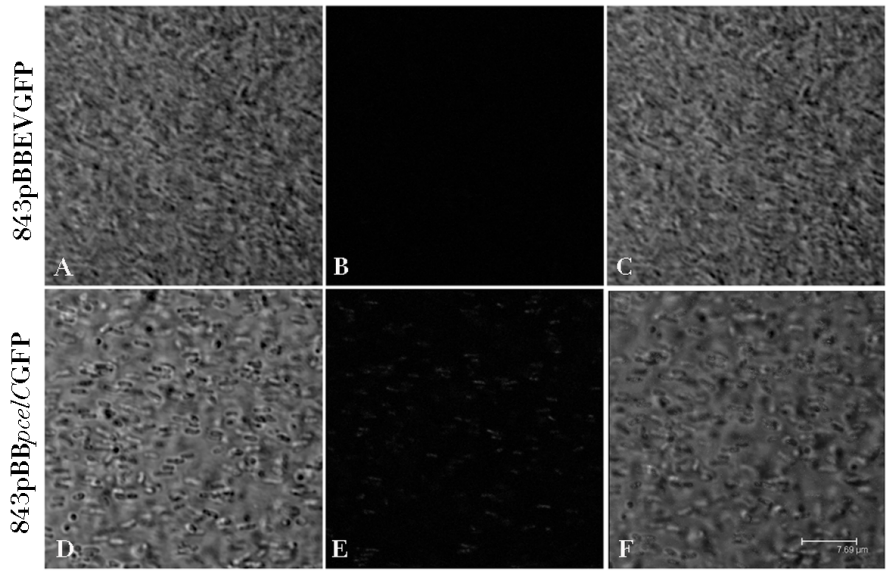


Figura 34. Microfotografía de cultivos puros de las cepas recombinantes ANU843pBBEVGFP (A, B, C) y ANU843pBB*pcelC*GFP (D, E, F). Imágenes tomadas mediante microscopía de fluorescencia; A y D, campo claro; B y E, canal fluorescencia verde; C y F, canales solapados.

Como podemos observar en la imagen (figura 34), los cultivos puros de las dos cepas recombinantes no muestran fluorescencia verde, por lo que se deduce que la fusión transcripcional creada no funciona en estas condiciones,

es decir, el gen *celC* no se ve inducido o al menos expresado de una manera patente en cultivo puro.

3. 2 Efecto en producción de celulosa y colonización de esta secuencia reguladora

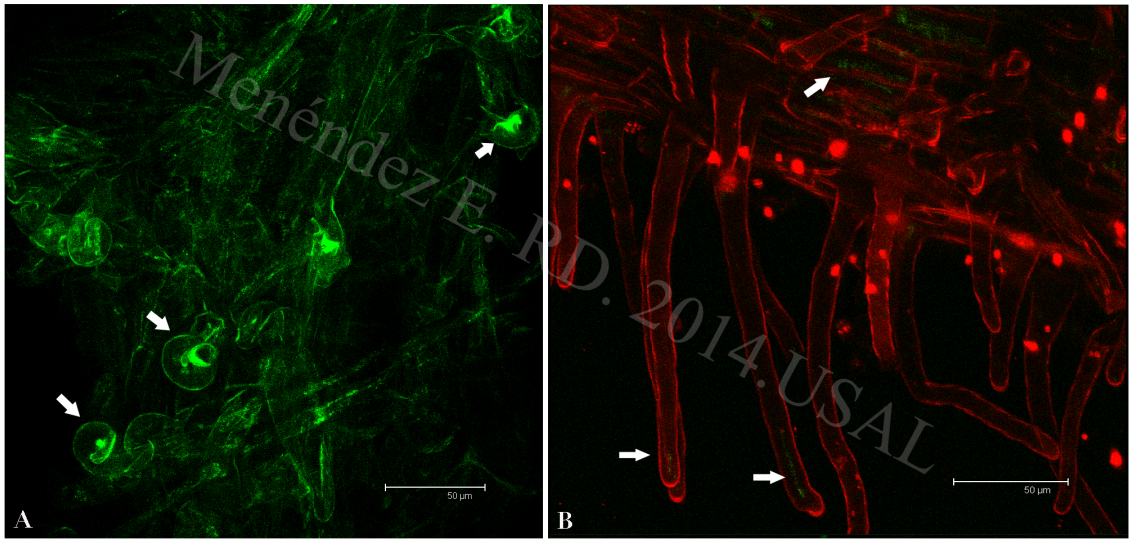
Como paso previo a la inoculación *in planta*, quisimos conocer si la presencia de este plásmido en la cepa ANU843 inducía un cambio en la producción de celulosa ensayada anteriormente para esta cepa, por lo que realizamos unas siembras en placa con Rojo Congo. Pasado un tiempo de incubación, se observa que no existe variación de coloración entre la cepa ANU843pBBpcelCGFP, respecto de sus controles, ANU843 silvestre y ANU843pBBFTGFP.

3. 3 Localización de la expresión *in planta*

Una vez obtenidas y comprobadas dichas fusiones transcripcionales, procedimos a evaluar su efecto *in planta*, por lo que decidimos realizar ensayos de infección y nodulación en trébol, planta homóloga de la cepa ANU843, la cual hemos utilizado para probar esta fusión.

Tras la inoculación y posterior incubación en cámara iluminada (condiciones controladas de humedad y temperatura), seleccionamos distintas raíces y nódulos y las observamos mediante microscopía confocal, utilizando un microscopio confocal láser Leica Sp2 en el Servicio de Microscopía del Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL).

En un primer lugar, realizamos observaciones en pelos radicales para analizar la expresión de la celulasa CelC2 en infección primaria (figura x), ya que dicha enzima degrada la pared celular del extremo apical de los pelos radiculares, por lo que, con esta fusión deberíamos corroborar este fenotipo. En algunas ocasiones, se utilizó ioduro de propidio (rojo) como contraste.

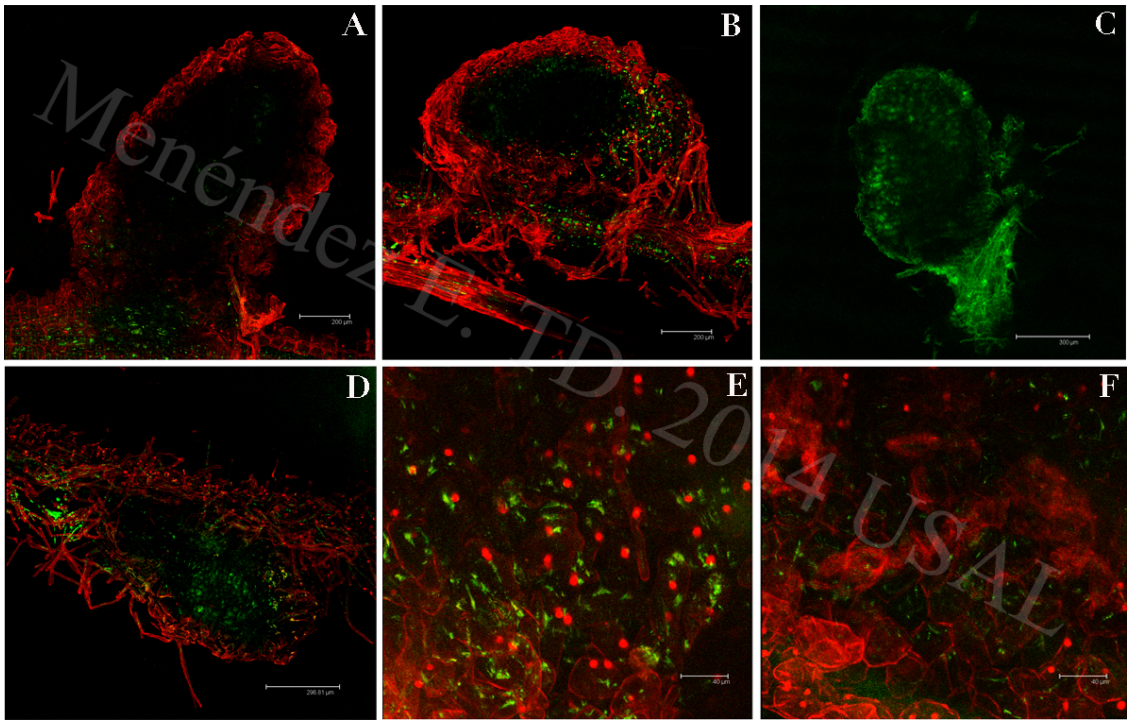


Menéndez E. PD. 2014.USAL

Figura 35. Microfotografías de pelos radiculares de *Trifolium repens* inoculados con la cepa ANU843 que contiene la construcción *pcelC::gfp*. Se muestra la expresión de *pcelC* en curlings (A) y canales de infección (A, B), concidiendo con los lugares de acción de la celulasa CelC2. Las flechas señalan los curlings en el panel A y los canales de infección en el panel B.

Como está descrito en la literatura, la celulasa CelC2 realiza, de una manera muy regulada, un orificio en el ápice del pelo radicular del trébol, donde se localiza la celulosa no cristalina, sustrato de esta enzima. Utilizando esta construcción, comprobamos que este gen se está expresando en este punto, además de expresarse dentro de los canales de infección, por donde discurren las bacterias hacia el interior nodular. Con esta fusión, se pone de manifiesto que, además de la expresión del gen, existe una secuencia localizada en el gen anterior (*celB*), que regula positivamente la expresión de *celC*. Además, la no existencia de fluorescencia en el cultivo puro nos hace pensar que este promotor se induce en contacto con la planta.

Siguiendo el camino de *Rhizobium* hacia el interior de las células del córtex que van a desarrollar el nódulo, observamos la expresión en el interior nodular (figura 36).



Menéndez E. TD. 2014 USAL

Figura 36. Expresión en nódulos de trébol de la fusión *pcelC::gfp*. La celulasa CelC se está expresando en la zona de infección del nódulo (B, C, D). Además se detecta expresión en los pelos radicales de la base del nódulo, que suelen ser lugares de entrada de rizobios (A, E), así como colonizando superficies celulares y espacios intercelulares (E, F). La expresión de este gen continúa hasta que se forma el simbiosoma, donde el rizobio se ha diferenciado.

Como podemos observar en el panel C, esta enzima se sigue expresando en la zona II o zona de infección del nódulo, zona de liberación de las bacterias al final del canal de infección. Una vez en este punto, comienza la diferenciación en simbiosoma. La no aparición de fluorescencia en la zona de fijación y en la zona de senescencia nodular podría indicar que este enzima no se expresa a partir de la diferenciación de la bacteria en bacteroide y formación del simbiosoma.

La aparición de fluorescencia pone de manifiesto que la secuencia clonada como posible promotor y/o secuencia reguladora interior del gen *celC* funciona, por lo que tenemos un punto más a favor de la idea de una posible regulación propia de dicho gen, independientemente de la regulación del operón entero. Sin embargo, sería necesario profundizar en el conocimiento de esta regulación interna, mediante la acotación de la secuencia clonada y así poder determinar con exactitud esta secuencia reguladora de acuerdo con las predicciones bioinformáticas.

Además, en este sentido y observando los resultados obtenidos en los análisis *in silico* y la possible regulación interna del operón decidimos comenzar los estudios para conocer mejor las funciones del operón *celABC* en el género *Ensifer*, en el cual existe similitud con los analizados en el género *Rhizobium*.

el género *Ensifer*, en el cual existe similitud con los analizados en el género *Rhizobium*.

4. El operón *celABC* en el género *Ensifer*

Debido a la importancia de la producción de celulosa y a los estudios llevados a cabo por Robledo y colaboradores en especies del género *Rhizobium* y afines (Robledo *et al*., 2012), decidimos estudiar la producción de celulosa en las especies tipo y especies modelos disponibles del género *Ensifer*, ya que dicha producción de celulosa junto con la formación de biofilms ha sido poco estudiada en este género, con la excepción de la especie *E. meliloti*.

Dentro del género *Ensifer* existen especies que poseen genes de biosíntesis de celulosa incluyendo homólogos al operón *celABC* (tabla 28), con la salvedad de que en este género, la mayoría de los genes de biosíntesis de celulosa se localizan en plásmidos simbióticos, como ocurre en *E. medicae* WSM419 o *E. fredii* HH103, entre otras, aunque existen algunas cepas que los contienen en el cromosoma, como *E. adhaerens* OV14.

Tabla 28. Especies dentro del género *Ensifer* con secuencias similares al operón *celABC*.

Especie	Genes que componen el operón	Dominios proteicos	Situación en el genoma	% Similitud proteína
E. fredii USDA257	bcsA/celB/USDA257_c11960	PF13642/PF07238-PF03170-PF01270	Cromosómica	78%/48%/58%
E. fredii NGR234	celA/celB/celC	PF13642/PF07238-PF03170-PF01270	Plasmídica (pNGR234b)	78%/48%/57%
E. fredii HH103	celC/celB/celA (antisentido)	PF13642/PF07238-PF03170-PF01270	Plasmídica (pSfHH103e)	79%/48%/57%
E. medicae WSM419	Smed_5208/Smed_5209/Smed_5210	PF13642/PF07238-PF03170-PF01270	Plasmídica (pSMED02)	77%/45%/58%
E. meliloti GR4	C770_GR4pC1240/C770_GR4pC1241/C770_GR4pC1242 (antisentido)	PF13642/PF07238-PF03170-PF01270	Plasmídica (pRmGR4c)	76%/45%/58%
Ensifer sp. BR816	celA/celB/celC	PF13642/PF07238-PF03170-PF01270	No consta (genoma preeliminar)	78%/48%/58%
E. adhaerens OV14	celA/celB/celC	PF13642/PF07238-PF03170-PF01270	Cromosómica (cromosoma 1)	77%/49%/59%

Dentro de este género, y como veremos posteriormente en los ensayos de producción de celulosa, existen más especies que producen este polímero aunque no tienen porqué poseer el operón *celABC*. De hecho, y a falta de tener los genomas de los demás miembros del género, se han identificado otros operones en *E. meliloti* 1021, como por ejemplo el denominado *celIJK*, que consta de tres genes (*SM_b20460, SM_b20461, SM_b20462*) que codifican para una celulosa sintasa con dominio perteneciente a la familia GT21 (PF13506), una proteína de función desconocida con dominio también de

función desconocida (PF06191) y una endoglucanasa H con dominio perteneciente a la familia GH26 (PF02156). Este operón se encuentra en el plásmido simbiótico pSymB, no existiendo otros operones similares en su cromosoma ni en su plásmido simbiótico pSymA. Según las predicciones bioinformáticas, este operón también se encuentra en otras cepas de *E. meliloti*, como son AK83 (*Sinme_3724, Sinme_3723, Sinme_3722*), SM11 (*orf74, orf73, orf72*) y BL225C (*SinmeB_4220, SinmeB_42219, SinmeB_4218*). Además, la misma *E. medicae* WSM419, que posee el operón *celABC*, posee este operón (*Smed_3671, Smed_3670, Smed_3669*). En todas las cepas con el genoma secuenciado que contienen este segundo operón, exceptuando la cepa AK83, la localización del operón es plasmídica.

Debido a la importancia que tiene la biosíntesis de celulosa en la adhesión y colonización de diferentes sustratos, el estudio en profundidad del operón *celABC* y similares cobra una gran importancia. Los trabajos publicados recientemente en los que se propone un rol importante de la celulasa CelC2 en la colonización de sustratos (Robledo *et al*., 2012) y un papel esencial en la interacción simbiótica *Rhizobium – Trifolium* (Robledo *et al*., 2008; 2011) hace necesaria la caracterización de su función en otros sistemas simbióticos, obteniendo mutantes que confirmen la implicacion de dicho enzima.

Por ello, en los apartados siguientes se muestra como se han obtenido mutantes que expresan heterólogamente el gen *celC* de *Rhizobium* en distintas especies de *Ensifer* y además, la obtención de mutantes que sobreexpresan el gen *celC* de *Ensifer medicae* WSM419, con un 70% de similitud al gen *celC* de *Rhizobium*, al igual que posee un alto porcentaje de similitud en los otros dos genes que conforman el operón *celABC*.

5. Obtención y caracterización bioquímica de mutantes sobreproductores de celulasa CelC2 de *Rhizobium* y su ortólogo CelC en *Ensifer*.

Como hemos visto anteriormente, el gen *celC*, presente en *Rhizobium* y en algunas cepas de *Ensifer*, codifica para una celulasa/endoglucanasa que está implicada en la biosíntesis de celulosa. Esta celulasa es una glicosil hidrolasa, posiblemente situada en el espacio periplásmico adherida a la membrana externa, que modula la longitud de las microfibrillas de celulosa, las cuales intervienen en la adhesión y colonización de sustratos. Robledo y colaboradores describieron cómo una superproducción de dicha celulasa de *Rhizobium* afectaba la capacidad de colonización de estas bacterias, no presentando microfibrillas de celulosa externas a la célula bacteriana (Robledo *et al.,* 2012).

En este sentido, decidimos obtener mutantes superproductores de dicha celulasa en *E. meliloti* 1021, puesto que no posee homólogos a dicha celulasa y resulta un buen modelo y control para estudios de colonización de

sustratos. Además, debido a la presencia de una celulasa similar en *E. medicae* WSM419, decimos sobreexpresar, su propia celulasa y adicionalmente la celulasa de *Rhizobium*, para evaluar sus efectos en la formación de biofilms y en producción de celulosa, además de observar sus efectos en otros eventos de la interacción con leguminosas, como veremos en los capítulos siguientes.

5. 1 Obtención de cepas transformantes de *Ensifer* que expresan la celulasa CelC2.

Para la obtención de una cepa recombinante que exprese la celulasa CelC2 tanto en *E. meliloti* 1021 como en *E. medicae* WSM419, se transformaron ambas cepas con un vector estable en rizobios que expresa constitutivamente el gen *celC*, denominado pJZC2 (Robledo *et al*., 2011). Mediante conjugación triparental, utilizando como donadora *E. coli* DH5**α** que contenía dicho plásmido, se seleccionaron las colonias que fueron resistentes a kanamicina, resistencia antibiótica del plásmido original pBBR1-MCS-2 (Kovach *et al*., 1998). Este plásmido original se utilizó para realizar transformantes "*empty vector*" de ambas cepas que se seleccionaron de igual manera y que se utilizaron como cepas control. De esta manera se generaron 4 cepas transformantes: *E. meliloti* 1021EV, 1021C2$^+$(Robledo *et al*., 2014 *in prep*), *E. medicae* WSM419EV y WSM419C2$^+$.

Los transformantes se incubaron en placas de medio TY suplementado con el antibiótico y la concentración seleccionada, en este caso, kanamicina a una concentración de 50 µg/ml para *E. medicae* WSM419 y a una concentración de 200 µg/ml para *E. meliloti* 1021. Una vez obtenidas, se confirmaron mediante PCR, utilizando los primers C1F y C2R que amplifica un fragmento del gen *celC* insertado en el plásmido. La confirmación por PCR de estas cepas es suficiente ya que no se consiguió amplificar ningún fragmento en las cepas silvestres con estos primers.

Posteriormente, estas cepas obtenidas fueron sometidas a distintos ensayos de actividad enzimática para comprobar su capacidad de producción de actividad carboximetilcelulásica correspondiente a la celulasa CelC2.

5. 1. 1 Caracterización bioquímica de las cepas 1021C2$^+$ y WSM419C2$^+$.

Una vez obtenidas las cepas expresoras de la celulasa CelC2, se llevaron a cabo distintos ensayos enzimáticos para determinar, primero de una forma cualitativa y posteriormente de una manera cuantitativa, la actividad celulásica de los extractos proteicos obtenidos a partir de las cepas silvestres y de sus mutantes expresores. Para confirmar esta actividad, se utilizó como sustrato un derivado comercial soluble de la celulosa denominado carboximetilcelulosa (CMC).

5. 1. 1. 1 Ensayos de difusión en placa

Como una primera aproximación, se obtuvieron extractos proteicos de las cepas de estudio por sonicación y se observó la capacidad de degradación de carboximetilcelulosa por tinción con Rojo Congo.

Los ensayos se realizaron depositando 5 µL del extracto sonicado correspondiente de cada cepa a estudio sobre una placa en doble capa. Esta placa consta de una capa inferior de agarosa al 0,7% y una capa superior de agarosa al 0,5% y CMC al 0,2% en PCA 100mM pH5. Se incuba esta placa a 37ºC durante una noche y se tiñe con una solución de Rojo Congo al 0,1%. Transcurrido un tiempo, se lava la superficie de la placa poniendo de manifiesto los halos de hidrólisis formados (figura 37).

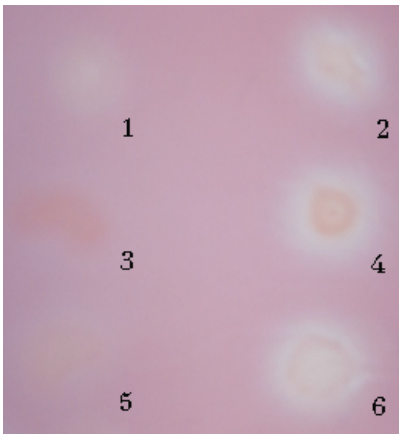


Figura 37. Detección de actividad carboximetilcelulásica en placa de doble capa de los extractos proteicos obtenidos por sonicación de las diferentes cepas. La numeración de la imagen se corresponde por orden a 1) ANU843, 2) ANU843C2$^+$, 3) 1021, 4) 1021C2$^+$, 5) WSM419 y 6) WSM419C2$^+$.

Este ensayo confirma la expresión del gen *celC* en las cepas 1021C2$^+$ y WSM419C2$^+$, ya que se observan halos de hidrólisis mayores respecto de las cepas silvestres. El extracto de la cepa WSM419 muestra un halo de hidrólisis muy difuso y el extracto de la cepa 1021 no produce prácticamente ninguna hidrólisis. Esta observación puede deberse a que las condiciones del ensayo son óptimas para la actividad de la celulasa CelC2 y no para otras, por lo que estas cepas podrían poseer otras celulasas que funcionen bajo condiciones diferentes a las seleccionadas y de hecho las producen como por ejemplo la celulasa M y la endoglucanasa codificada por el gen *SM_b20466* de *E. meliloti* 1021.

5. 1. 1. 2 Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE y zimograma.

Seguidamente, se llevó a cabo la detección de isoenzimas con actividad celulolítica en los extractos proteicos de las cepas de estudio mediante, en un

primer lugar, una separación de las proteínas contenidas en el extracto, realizándose una electroforesis en condiciones semidesnaturalizantes (Jiménez-Zurdo *et al.*, 1996). En segundo lugar, se realizó la detección de actividad poniendo en contacto los geles de poliacrilamida con geles de agarosa que contenían 0,2% de CMC y revelando con Rojo Congo, al igual que se realizó con las placas en doble capa. Con ello, se visualizaron las zonas de hidrólisis que corresponden con la banda detectada de la celulasa CelC2 (figura 38).

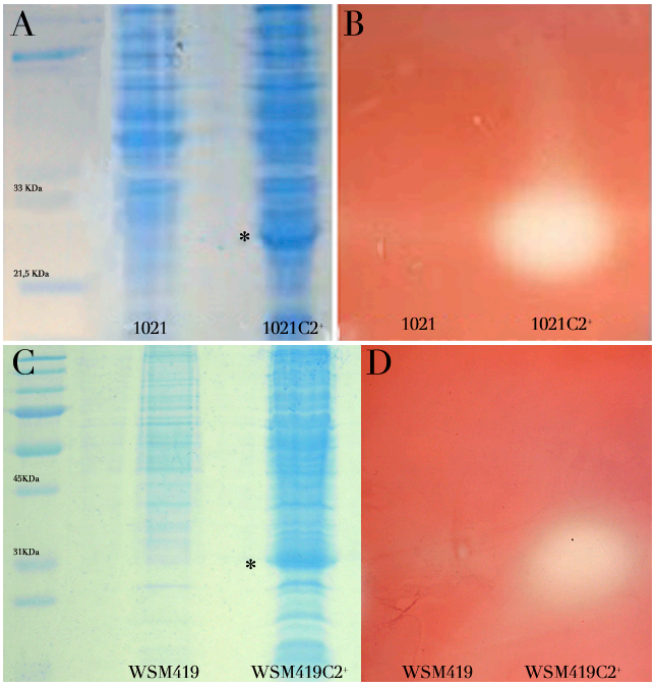


Figura 38. Separación y detección de isoenzimas mediante SDS-PAGE (A, C) y zimograma (B, D), respectivamente, realizados con los extractos celulares de las cepas a estudio, *E. meliloti* 1021 y 1021C2$^+$ (A, B) y *E. medicae* WSM419 y WSM419C2$^+$ (C, D). Los asteriscos indican las bandas correspondientes a la acumulación de la proteína CelC2.

En el gel de poliacrilamida se puede observar una acumulación de proteína de un determinado peso molecular en los carriles correspondientes a las cepas 1021C2$^+$ y WSM419C2$^+$. Esta banda no existe en los carriles ocupados por las cepas salvajes. La banda obtenida, señalada con asteriscos, concuerda en situación y peso molecular (31,5 KDa) con la banda obtenida por Robledo y colaboradores al caracterizar el mutante superproductor de CelC2 en la cepa ANU843 (Robledo *et al.*, 2011). En el zimograma realizado, observamos que realmente había actividad hidrolítica ya que, al revelar la membrana con Rojo Congo, se observa que a la altura de las bandas que se observan en el gel de acrilamida, existen halos de hidrólisis de CMC. Este halo no existe en el carril de la cepa 1021 pero sí en los carriles de las cepas mutantes, lo que confirma que la banda tiene actividad celulásica y que ésta es similar a la obtenida en los estudios publicados con anterioridad. Además, en

el carril correspondiente a la cepa WSM419 se puede observar con dificultad un halo de hidrólisis a la misma altura que el correspondiente a la cepa superproductora.

5. 1. 1. 3 Cuantificación de la actividad celulolítica.

A continuación, se realizó un ensayo de cuantificación de dicha actividad celulásica en los extractos obtenidos de las cepas de estudio, tanto cepas silvestres como mutantes superproductores. Para ello, se utilizó el método de valoración de azúcares reductores propuesto por Waffenschmidt y Jaenicke en 1987 y modificado por Mateos y colaboradores en 1992 (Figura 39).

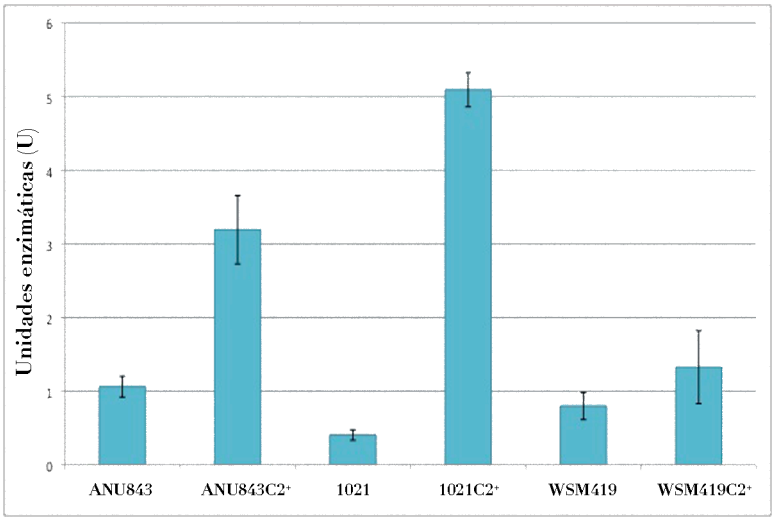


Figura 39. Cuantificación de la actividad celulásica en extractos celulares por el método BCA. Los resultados se muestran en unidades enzimáticas (U), que se definen como la cantidad de enzima que libera un nmol del azúcar reductor equivalente (en este caso, glucosa) por minuto a 40ºC y pH5. Los resultados corresponden a la media de 3 determinaciones independientes. Las barras de error muestran la desviación estándar.

Los resultados obtenidos en este ensayo cuantitativo confirman un incremento en la actividad en las cepas 1021C2$^+$ y WSM419C2$^+$ respecto a sus cepas silvetres. Esta actividad es casi 6 veces mayor que la detectada en la cepa ANU843 y dos veces superior a la detectada en la cepa ANU843C2$^+$ en el caso de la cepa 1021C2$^+$. Este hecho probablemente se deba a un incremento en el número de copias del plásmido pJZC2 en la cepa 1021C2$^+$, respecto a la cepa ANU843C2$^+$. En cuanto a la cepa WSM419C2$^+$, la actividad enzimática detectada duplica la actividad detectada en la cepa silvestre WSM419. Aún así esta actividad es menor que en las cepas ANU843C2$^+$ y 1021C2$^+$, debido posiblemente a un menor número de copias de este plásmido.

Por otro lado, también existe una pequeña actividad en la cepa 1021, que no es debida a la celulasa CelC2, como indican los datos representados en

la tabla 26 (pag. 7). Esta pequeña actividad concuerda con los datos obtenidos por Jiménez-Zurdo y colaboradores, que midieron la actividad carboximetilcelulásica de *Ensifer meliloti* ATCC9930, cepa tipo, y obtuvieron valores similares a los obtenidos en este ensayo (Jiménez-Zurdo *et al.*, 1996).

5. 1. 1. 4 Detección mediante Inmunoblot

Para despejar cualquier duda en cuanto a la posibilidad de la existencia de una celulasa similar con actividad y gracias a la disponibilidad de anticuerpos específicos de dicha proteína, se realizó un Western Blot con los extractos sonicados y normalizados de dichas cepas (figura 40).

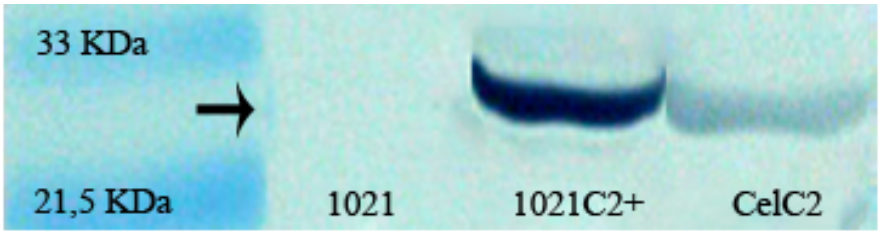


Figura 40. Western blot de los extractos obtenidos de las cepas de *E. meliloti* 1021 y 1021C2^{+}. Se incluye un control de celulasa CelC2 purificada.

En cada carril se insertaron las muestras con una concentración de proteína total de entre 4,5 y 5 mg/mL. También se incluyó como control positivo una muestra correspondiente a la CelC2 purificada de la cepa ANU843 a una concentración de 0,5 mg/mL (Robledo *et al.*, 2008). Se obtuvieron bandas correspondientes a dicha celulasa en el control positivo y en la cepa 1021C2^{+}.

En el caso de la cepa 1021 no se obtuvo ninguna banda correspondiente a la celulasa CelC2, confirmando que no existe en dicha cepa un homólogo a esta endoglucanasa.

5. 2 Obtención de cepas transformantes de *E. medicae* WSM419 que sobreexpresEn su propia celulasa CelC.

Para la obtención de la cepa recombinante de *E. medicae* WSM419 que exprese su propia celulasa, se clonó un fragmento de 1169 pb (Figura 41) que contiene el gen *Smed_5210*, que se identificó como 70% similar al gen *celC* de *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843 y que además codifica para una celulasa de la familia 8 de las glicosil hidrolasas, al igual que la CelC2. Este fragmento tambien contiene 93 nucleótidos *upstream* que corresponden al final del gen *Smed_5209* (*celB*).

CCAATTGGCTGTCGAGCAACATATTGGTGTACGCCGTGCTGCTCGTCTGCCTTGTCGTTCTGCTCGGATTGGCCACTGCTAGCCTACT
TGCCAGATTGGGGCGCCGCCAATGA**ATGAAGCCACTCGTCGTGCTAATGCTCCTGCTGCTAGCTTATCCGACGCATGCCCAGGAGCCA**
GCGACGGTGGAAGCAACGGCGTGGCAAAAGTATAAGACGCGATTTCTCGATCCGGGCGGCCGGATTATCGACGACGCCAACGGTGATA
TAAGCCATAGCGAGGGACAGGGTTACGGCCTTCTGTTGGCCTTTCTCGCGGGCAGCCGGGCCGATTTTGAACTCATCTGGTCGTTCAC
GCGCCGCGAACTCCTCCTGCGCGACGACGGCCTTGCGGCCTGGAAATGGAGTCCGGGCGAAGCGCCTCATGTTTCCGATACGAACAAT
GCAACAGACGGCGACATATTGATCGCCTATGCCTTGGCCCGTGCAGGGGTTTCCTGGGATCGCAAGGACTACACGCGTGCGGCTACTG
CGCTGGCAGAGGCGATTCTCGAGAAAACCGTCGTCGAACATGGGGGGCTGACCTTGCTCTTGCCGGGCGCGCAGGGATTTTCTGCGGC
CGATCGGGCCGACGGGCCCGTCATCAACCCGTCCTACTGGGTTTTCGAAGCCTTTCCGGTTCTCGAACAATTGGTTCCTTCTCCTGCC
TGGAAAGCGCTCGCAGCGGACGGTGAAGCTATTCTCAAGAGACTGGAGTTCGGGCCAAAGAAGTTGCCCGCCGACTGGATTAGTGCAC
GAACCGTGTTCAAGCCGGCGGAGGGCTTCCCGTCCGAATACGGCTATAACGCGCTGCGCATCCCGCTTTATCTTGTTCGCTCGGGAAG
GACAGACAGTGAGCTCCTTTCACGGATCTACAGGGGCATGTCCGACGCGAAAGGTGCGGTTTTGCTCAGCGATGTCGAAAGCGGTGCC
GTGGAGGAGACCCTTACCGATCCAGGTTATCGAATTATTAACCATATCCTGGCCTGTGTCCTCCAAGGGACGAAGCTCCCCGACGACA
TGAAAACGTTTGAACCGACCCAATACTATCCCTCGACAATGCACCTGCTGGGTTTGTCTTTCGTGGAGGAAATGCGTCCGGAGTGCCT
ATGAATGAAGTTCCCGATTGTTGCATCCATAGGTGTTGTGACCGCCGCGCTTGCCACCGCCGGGCTCGCCGGAGACGGGGAGTTGCCC
AGGGGATTGGCGCAGGTGATCGTCGATTCGGATCGAGCCGATG

Figura 41. Secuencia nucleotídica del fragmento clonado en el vector pBBR1-MCS-2, que contiene el gen *Smed_5210* (celulasa) de *E. medicae* WSM419. En negrita se resalta la secuencia correspondiente al gen; en verde y en azul se resaltan los primers *forward* y *reverse* utilizados para esta amplificación y que contienen sitios de corte EcoRI y XbaI, respectivamente.

El gen *Smed_5210* se encuentra en el plásmido simbiótico pSMED02, precedido por los genes *Smed_5209* y *Smed_5208* que son muy similares a los genes *celB* y *celA*, respectivamente, encontrándose los tres formando el operón *celABC*. Se extrajo DNA de este megaplásmido utilizando protocolos estándar (Sambrook, 1989) y se comprobó mediante amplificación del gen *nodC*, que se encuentra también en este megaplásmido.

Este fragmento se amplificó y se clonó entre los sitios EcoRI y XbaI de un plásmido comercial, el vector pGEMt-easy (Promega), guardándose esta construcción en *E. coli* DH5**α**. Seguidamente se cortó utilizando las enzimas de restricción seleccionadas anteriormente y se clonó en un pBBR1-MCS-2, guardándose posteriormente en *E. coli* DH5**α**. Este nuevo plásmido se denominó pEMC^{+} (figura 42).

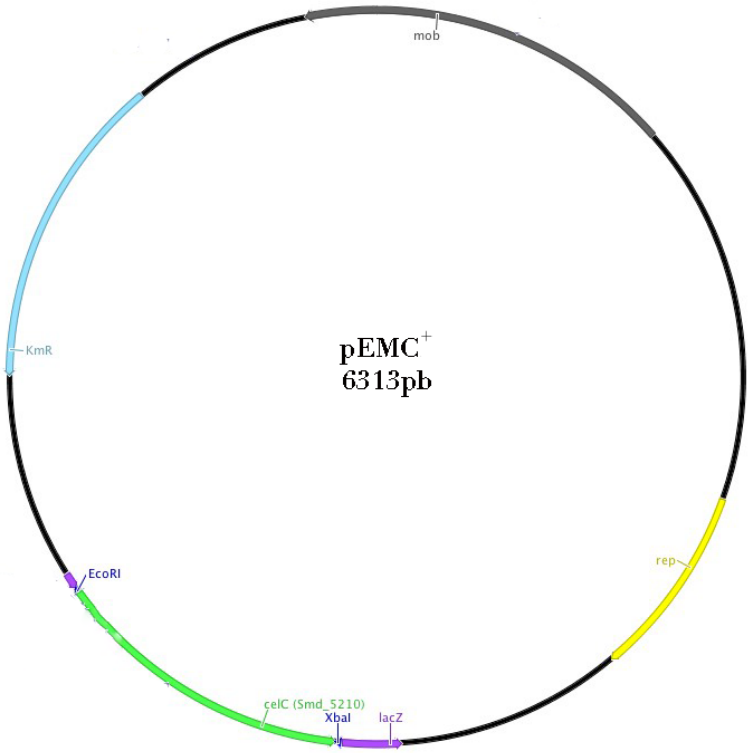


Figura 42. Esquema del plásmido pEMC$^+$, que contiene la celulasa de *Ensifer medicae* WSM419 clonada entre los sitios de restricción EcoRI y XbaI.

Este plásmido se introdujo por conjugación triparental en la cepa silvestre y los transformantes resultantes se seleccionaron por su resistencia a kanamicina, en este caso 300 µg/ml. Esta concentración nos aseguró un mayor número de copias del vector.

La cepa WSM419EMC$^+$ se comprobó mediante la extracción del DNA plasmídico y posterior digestión enzimática con las enzimas de restricción seleccionadas para su clonación, comprobándose la presencia de un fragmento de entre 1100 y 1200 pb.

5. 2. 1 Caracterización bioquímica de la cepa transformante WSM419EMC$^+$.

Una vez obtenida y confirmada la cepa transformante que contiene la celulasa, en un principio ortóloga a la celulasa CelC2 por estar alojada en un operón similar al *celABC* en un microorganismo diferente a *Rhizobium*, procedimos a la comprobación bioquímica de las características de esta cepa en relación a su actividad enzimática.

Para ello, seguimos los pasos que se describen en los apartados anteriores para la caracterización de la actividad de las cepas expresoras de la celulasa rizobiana CelC2.

5. 2. 1. 1 Ensayos de difusión en placa

En los ensayos en placa de doble capa de CMC (Figura 43), el extracto proteico sonicado de la cepa WSM419EMC$^+$ muestra un halo de hidrólisis claro, de mayor diámetro que la cepa WSM419 y las cepas ANU843 y ANU843C2$^+$, que en este caso las tomamos como control positivo.

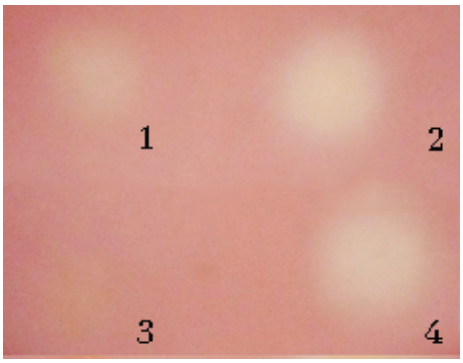


Figura 43. Detección de actividad carboximetilcelulásica en placa de doble capa de los extractos proteicos obtenidos por sonicación de las cepas WSM419 (3) y WSM419EMC$^+$ (4). Como control positivo de actividad se utilizaron los extractos de las cepas ANU843 (1) y ANU843C2$^+$ (2).

Se observa un halo de hidrólisis mayor en esta cepa superproductora respecto a la cepa superproductora de CelC2. La cepa WSM419 también produce un halo de hidrólisis, aunque débil en relación con la cepa ANU843. Este dato preeliminar nos sugiere que las condiciones óptimas y/o las características de esta nueva celulasa pueden variar relativamente respecto de las condiciones óptimas de actividad de la celulasa CelC2 (40ºC, pH 5).

5. 2. 1. 2 Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE y zimograma.

Seguidamente realizamos una SDS-PAGE y zimograma con el fin de separar las proteínas del extracto sonicado y detectar la actividad carboximetil celulásica (figura 44).

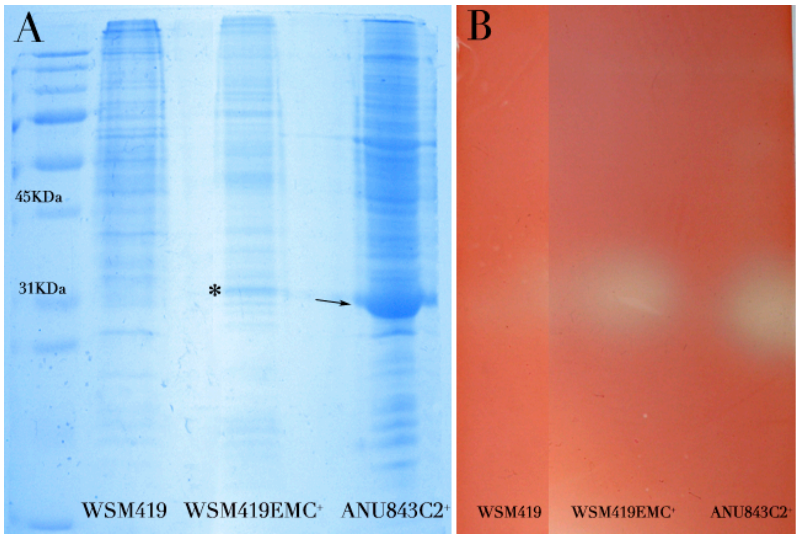


Figura 44. Separación y detección de isoenzimas mediante SDS-PAGE (A) y zimograma (B), respectivamente, realizados con los extractos celulares de las cepas a estudio, WSM419 y WSM419EMC$^+$, incluyendo un carril con el extracto de la cepa ANU843C2$^+$ como control. La flecha indica la banda correspondiente a la acumulación de la proteína CelC2 de *Rhizobium* y el asterisco indica la banda correspondiente a la acumulación de CelC de *Ensifer*.

En el gel de poliacrilamida se observa como el carril que contiene el extracto de la cepa superproductora de celulasa CelC2 de *Rhizobium* tiene una acumulación de proteína alrededor de 31 KDa, además, en el zimograma se observa su correspondiente actividad. En el carril de la cepa superproductora de la celulasa de WSM419 se observa una acumulación de una proteína con menor movilidad que la celulasa CelC2, alrededor de 33 KDa. Esta banda proteica posee actividad celulásica tal y como se observa en el zimograma.

Este dato sugiere una posible diferencia en esta celulasa de *Ensifer* respecto de la celulasa rizobiana. Por ello, en un futuro próximo, se debería caracterizar completamente esta nueva celulasa, tanto estructuralmente como bioquímicamente.

5. 2. 1. 3 Cuantificación de la actividad celulolítica.

Por último, quisimos cuantificar la actividad celulolítica mediante un ensayo de valoración de la reducción de azúcares o BCA del extracto sonicado de dichas cepas, adjuntando las cepas ANU843 y ANU843C2$^+$ como controles, al igual que en el caso anterior (figura 45).

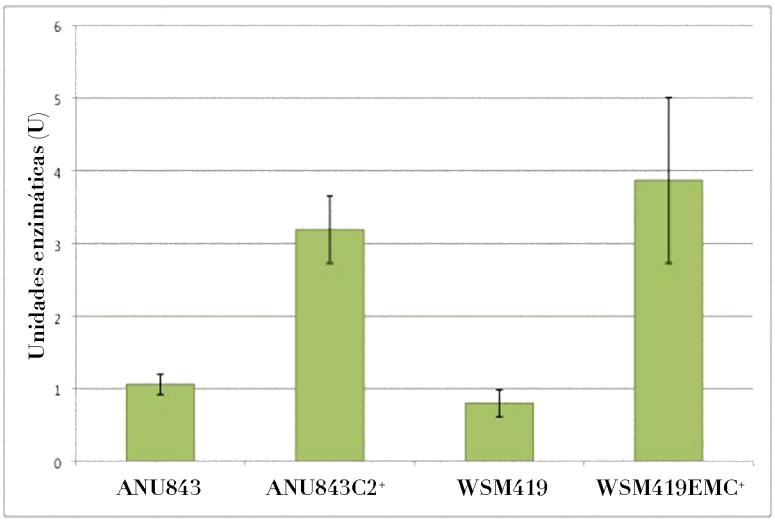


Figura 45. Cuantificación de la actividad celulásica en extractos celulares por el método BCA. Los resultados se muestran en unidades enzimáticas (U), que se definen como la cantidad de enzima que libera un nmol del azúcar reductor equivalente (en este caso, glucosa) por minuto a 40ºC y pH5. Los resultados corresponden a la media de 3 determinaciones independientes. Las barras de error muestran la desviación estándar.

Los resultados obtenidos muestran que esta cepa tiene una actividad enzimática tres veces superior a la actividad detectada en la cepa WSM419. Con respecto a la cepa ANU843, esta actividad es también casi tres veces superior. No obstante, la actividad enzimática detectada en este nuevo mutante superproductor de CelC (WSM419EMC$^+$) es sólo ligeramente superior a la detectada en el mutante superproductor de CelC2 (ANU843C2$^+$).

CAPÍTULO 2

Implicación de la expresión heteróloga de la celulasa CelC2 de *Rhizobium* en la colonización de superficies bióticas y abióticas: biosíntesis de celulosa y formación de biofilms.

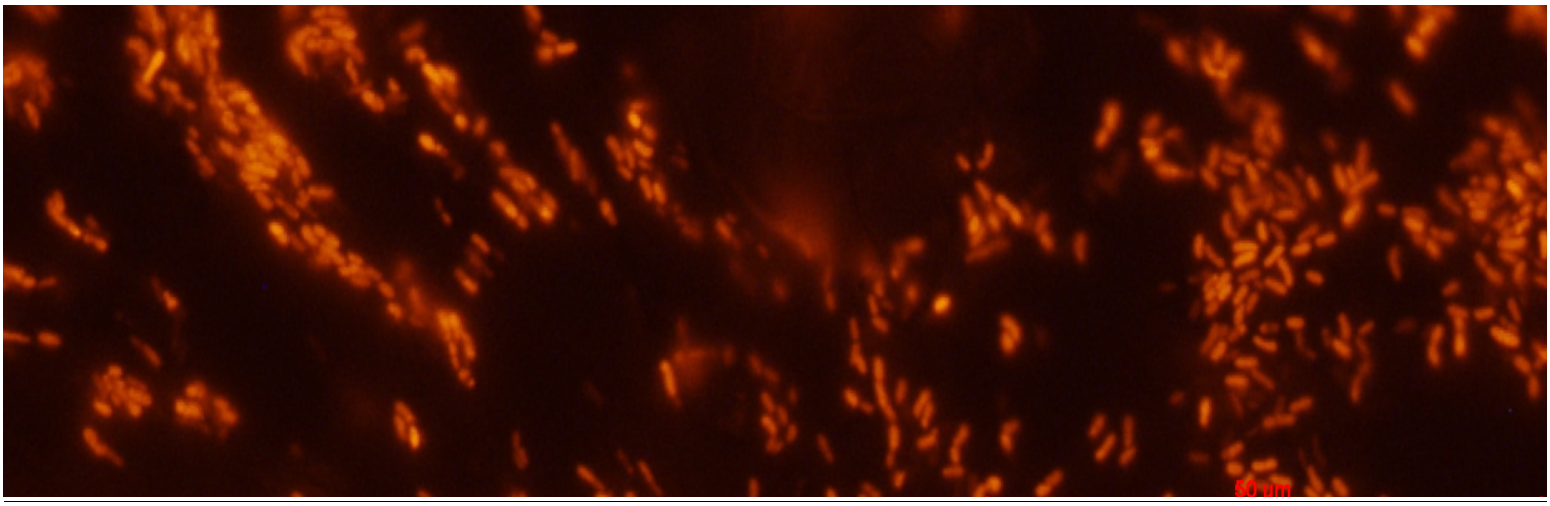


Imagen: Colonización de superficies radiculares de trébol por *Rhizobium cellulosilyticum* marcada con una proteína roja fluorescente.

1. Introducción

En el capítulo anterior, hemos realizado un análisis *in silico* del operón *celABC*, tanto en el género *Rhizobium* como en el género *Ensifer*, encontrándonos una alta similitud tanto en secuencia nucleotídica como en secuencia aminoacídica. Además, realizamos un estudio que confirma la posible existencia de una secuencia reguladora de la expresión del gen *celC* contenida en el gen *celB*, gen para el que se ha propuesto recientemente que codifica para una proteína estructural, como la subunidad B del complejo celulosa sintasa (Morgan *et al.,* 2013).

Debido a la implicación del operón *celABC* de *Rhizobium leguminosarum* y en concreto, del gen *celC* en la producción de celulosa, formación de biofilms y la colonización de superficies, tanto bióticas como abióticas (Robledo *et al.,* 2012), en este capítulo decidimos abordar cómo afecta la sobreexpresión heteróloga de CelC2 en los tres casos.

Además, el género *Ensifer* ha sido poco estudiado en cuestiones de producción de celulosa y capacidad de formación de biofilms, exceptuando *Ensifer meliloti* 1021 que al ser cepa modelo ha sido objeto de numerosos estudios. Por ello, hemos decidido realizar un estudio en la mayoría de las especies tipo de *Ensifer*, disponibles en el grupo de investigación, para conocer cómo se comporta dicho género en producción de celulosa y colonización de superficies.

2. Producción de celulosa y formación de biofilms en el género *Ensifer*.

En este apartado, presentamos una serie de datos obtenidos en distintas especies y cepas del género *Ensifer* que muestran una diversidad en su capacidad formadora de biofilms y productora de celulosa. Además, utilizando mutantes de algunas de estas cepas con una capacidad alterada en la producción de celulosa, demostramos la implicación de esta molécula en la formación de biofilms, poniendo de manifiesto su importante acción en la adhesión y colonización de superficies.

2. 1 Producción de celulosa en el género *Ensifer*

En diversos estudios se ha comprobado que existe un gran número de bacterias capaces de producir celulosa en cultivo puro, sobre todo en bacterias Gram negativas y especialmente en *G. xylinum,* bacteria modelo para la biosíntesis de celulosa. Esta capacidad también se encuentra en cianobacterias y en la bacteria Gram positiva *Sarcina ventriculi,* que ha sido aislada de la superficie de los cereales y otras plantas, en el tracto digestivo humano y en cerdos de Guinea (Nobles *et al*., 2004; Ross *et al*., 1991). También se ha estudiado la biosíntesis de celulosa en *Agrobacterium tumefaciens*, recientemente reclasificado dentro del género *Rhizobium,* en el que se han

caracterizado los operones *celABC* y *celDE*. Los genes contenidos en dichos operones no presentan homología con los genes de biosíntesis de celulosa de *G. xylinum* (Mathysse *et al*., 1995) por lo que el modelo en *A. tumefaciens* se ajusta mejor para nuestros estudios.

En nuestro grupo de investigación se ha conseguido detectar las microfibrillas de celulosa producidas por *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii ANU843, esenciales en el anclaje firme de la bacteria a la raíz de su planta hospedadora, el trébol blanco o *Trifolium repens* (Mateos *et al*., 1995). También se han publicado estudios que muestran la existencia de estas microfibrillas en *R. leguminosarum* bv trifolii R200 y en *R. leguminosarum* bv viciae 3841 (Ausmees *et al*., 1995; Williams *et al*., 2008).

Robledo y colaboradores examinaron la mayor parte de las cepas tipo de especies bacterianas simbiontes de leguminosas para comprobar el mayor o menor grado de producción de celulosa existente (figura 46), encontrando que todas las especies examinadas (52 especies examinadas en total) producían celulosa en mayor o menor grado. Además, comprobaron que existe una enorme variación que se mantenía incluso entre cepas de la misma especie (Robledo *et al*., 2012). Para su clasificación, establecieron una escala de coloración rosa pálido rojo intenso, con los tonos descritos en la "Royal Horticultural Society Color Chart" de la Royal Horticultural Society (1966) (Robledo, TD, 2010).

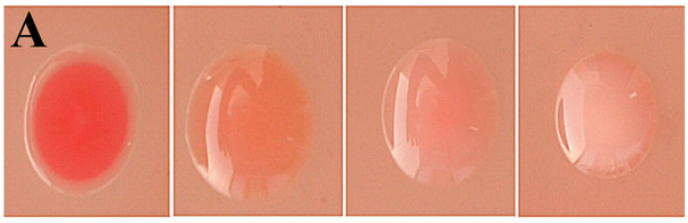


Figura 46. Colonias de distintos simbiontes de leguminosas en YMA suplementado con Rojo Congo. Escala compuesta de izquierda a derecha por *R. celullosilyticum* ALA10B2^{T} (+++), *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843 (++), *R. hainanense* I66^{T} (+) y *E. kostiense* LMG19227^{T} (-) (modificado de Robledo *et al*., 2012).

Para estimar la mayor o menor capacidad de producción de celulosa se realizó una tinción con Rojo Congo (RC). Este compuesto se une a polímeros con enlaces ß(1-4) glucosa, como por ejemplo la celulosa. La diferencia en las tonalidades rojizas observadas en las colonias se correlaciona con la capacidad y/o cantidad de producción de celulosa. Además, existen estudios que demuestran que a mayor concentración de carboximetilcelulosa (CMC), utilizada como sustrato para detectar la actividad celulásica, se origina una mayor formación del complejo CMC-RC que es directamente proporcional al incremento en la tonalidad roja de la colonia (Ausmees *et al*., 1999; Moreno and Uribe-Velez, 2011).

Para estudiar la capacidad de producción de celulosa en el género *Ensifer* suplementamos el medio TY, medio rutinario de cultivo de las cepas de *Ensifer*, con 25 mg/L de Rojo Congo. Tras 2-3 días de incubación a 28ºC, observamos que todas las cepas poseían una coloración rosácea-rojiza en mayor o menor medida. No obstante y debido a la coloración del medio TY, este ensayo no nos permitía diferenciar correctamente la producción de celulosa. Por ello, repetimos el ensayo utilizando medio YMA (rico en carbohidratos) suplementado igualmente con 25 mg/L de Rojo Congo. Tras 2-3 días de incubación a 28ºC, el color y la mucosidad se evidenciaban mejor. Para resaltar el color de las colonias, se mantuvieron las placas a 4ºC durante una noche (figura 47).

De esta manera, analizamos todas las cepas tipo de 16 especies del género *Ensifer* descritas en la actualidad y además, de dos cepas modelo, comprobando que al igual que ocurre en *Rhizobium* hay una muy marcada diversidad de producción, siendo *E. medicae* WSM419 la mayor productora (colonia número 17) y *E. saheli* LMG7837^T o *E. meliloti* 1021 las de menor producción (colonias número 18 y 16, respectivamente) (figura 47).

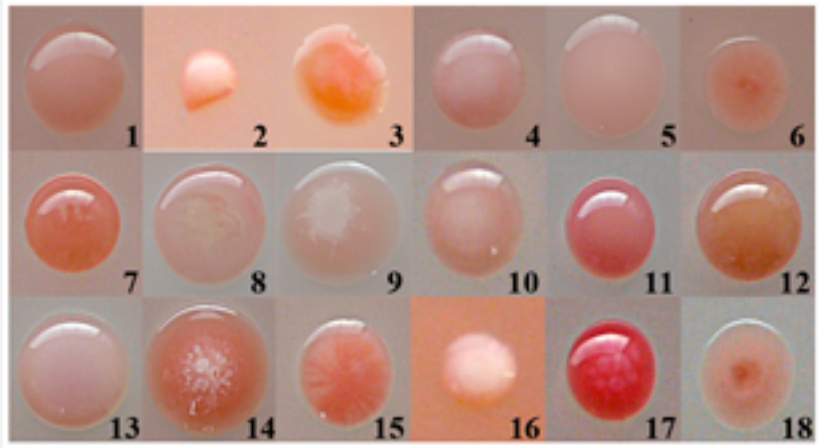


Figura 47. Producción de celulosa de las distintas especies del género *Ensifer*. 1. *E. fredii* LMG6217^T, 2. *E. saheli* LMG7837^T, 3. *E. numidicus* LMG2490^T, 4. *E. americanum* CFNEI156^T, 5. *E. kostiense* LMG19227^T, 6. *E. meliloti* ATCC9930^T, 7. *E. medicae* USDA 1037^T, 8. *E. adherens* LMG20216^T, 9. *E. garamanticus* LMG24692^T, 10. *E. kummerowiae* CCBAV71714^T, 11. *E. chiapanecum* ITTG570^T, 12. *E. terangae* LMG7834^T, 13. *E. mexicanum* ITTGR7^T, 14. *E. morelense* LCO4^T, 15. *E. arboris* LMG 14919^T, 16. *E. meliloti* 1021, 17. *E. medicae* WSM419, 18. *E. sojae* LMG25493^T.

Esta diversidad en producción la podemos clasificar de una manera cualitativa de acuerdo con la escala utilizada por Robledo y colaboradores para ordenar las cepas ensayadas para producción de celulosa en una escala, siendo las cepas que no produzcan nada de celulosa en presencia de Rojo Congo en el medio y +++ las mejores productoras (Tabla 29)

Tabla 29. Producción de celulosa en especies del género *Ensifer.* Escala cualitativa de color de acuerdo con la escala de la "Royal Horticultural Society Color Chart" de la Royal Horticultural Society (1966).

Especie	Producción de celulosa
E. fredii LMG6217^T	+
E. saheli LMG7837^T	-
E. numidicus LMG2490^T	++
E. americanum CFNEI156^T	+
E. kostiense LMG19227^T	+
E. meliloti ATCC9930^T	+
E. medicae USDA 1037^T	++
E. adherens LMG20216^T	+
E. garamanticus LMG24692^T	+
E. kummerowiae CCBAV71714^T	+
E. chiapanecum ITTG570^T	+++
E. terangae LMG7834^T	++
E. mexicanum ITTGR7^T	+
E. morelense LCO4^T	++
E. arboris LMG 14919^T	++
E. meliloti 1021	-
E. medicae WSM419	+++
E. sojae LMG25493^T	+

Esta diversidad cualitativa en producción de celulosa también la hemos observado al analizar distintas cepas de una misma especie, como por ejemplo la cepa WSM419 de *E. medicae*, que tiene una tonalidad rojo brillante intenso, y la cepa tipo, *E. medicae* USDA 1037^T, que tiene una tonalidad roja apagada. En cambio en las cepas tipo de *E. meliloti*, ATCC9930^T y en la cepa modelo 1021, la diferencia de tonalidad no es tan clara como entre las cepas de *E. medicae*, aunque sí se aprecia un tono más blanquecino en la cepa 1021.

Por este motivo, podemos decir que la producción de celulosa es cepa dependiente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos al analizar varias cepas de la misma especie de *R. leguminosarum* (Robledo *et al*., 2012).

El hecho de que *E. meliloti* 1021 no muestre producción de celulosa o al menos coloración rojiza en la tinción con Rojo Congo puede ser debido a que tiene alterada la formación de exopolisacárido (Glazebrook and Walker, 1989) ya que no es buena formadora de biofilms (Fujishige *et al*., 2006). Además, en el genoma de 1021, totalmente secuenciado (Galibert *et al*., 2001), no se han encontrado regiones homólogas al operón *celABC*. Sin embargo, sí se ha localizado un posible operón asociado con la biosíntesis de celulosa, denominado operón *celIJK*, que contiene una endoglucanasa (familia 26 de glicosil transferasas) asociada a una celulosa sintasa y que presenta homólogos en todos los genomas de *Rhizobium, Ensifer* y *Mesorhizobium* secuenciados

hasta el momento (Robledo, TD, 2010). Estos datos podrían apuntar a la posibilidad de que *E. meliloti* 1021 necesite un inductor para realizar una buena colonización de superficies, que no esté presenrte en las condiciones *in vitro* que le proporcionamos.

2. 2 Formación de biofilms en el género *Ensifer*

Numerosos estudios apuntan a que la celulosa es uno de los componentes presentes en los biofilms, la cual forma parte de la estructura propia de la biopelícula. Mutantes deficientes en producción de celulosa presentan una menor formación de biofilms, a los cuales les falta el componente estructural, debido a la propia deficiencia del mutante para producir este polisacárido (Robledo *et al*., 2012).

Como hemos observado en el apartado anterior, las especies del género *Ensifer* poseen diferentes gradaciones en producción de celulosa. Debido a la participación de la celulosa en la formación de biofilms, se realizaron ensayos de biofilm en placas de polivinil cloruro (PVC) para evaluar la capacidad de cada especie (figura 48) y así poder indentificar buenas formadoras de biofilm, característica importante en la colonización de plantas, ya que una buena especie formadora de biofilms, colonizará mejor las superficies radiculares ya que tendrá una mayor probabilidad de permanecer unida a las superficies radiculares de la planta.

La forma de realización de estos ensayos, llevados a cabo en placas de microtitulación, supone una manera eficaz, sencilla y de bajo coste para realizar estimaciones de la formación de biofilms en bacterias (Hirsch, 2011).

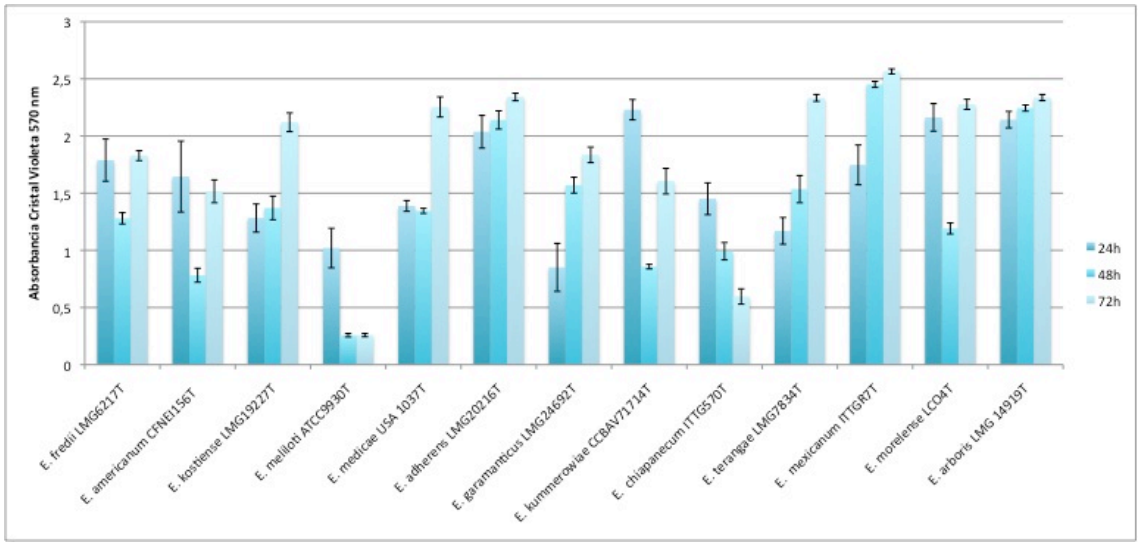


Figura 48. Ensayo de formación de biofilms en placas de polivinilcloruro de las distintas especies que conforman el género *Ensifer*. Este ensayo se realiza a distintos tiempos de crecimiento estático en medio rico. La capacidad de formación de biofilms de las especies de estudio se midió a una DO 570nm, después de una tinción

con Cristal Violeta al 0,3%, resuspendiendo las películas bacterianas que se formaron en el fondo en una solución etanol:acetona 4:1. Cada columna representa el valor medio de al menos 12 pocillos. Las barras de error representan el error estándar.

Al analizar, mediante este método, la capacidad formadora de biofilms en 13 de las 16 especies tipo descritas de *Ensifer (Sinorhizobium),* se puso de manifiesto la diversidad existente entre especies del mismo género. Además, se pueden observar 3 patrones en cuanto a la maduración de los biofilms a lo largo del tiempo, un primer patrón como es el ocurrido con la especie tipo *E. chiapanecum* ITTG570^T supone una disminución, un segundo patrón como lo ocurrido en *E. arboris* LMG14919^T un incremento y un tercer patrón como el ocurrido en *E. fredii* LMG6217^T en el que a las 24 horas presenta un máximo de formación de biofilm y a las 48 horas disminuye para volver a incrementar a las 72 horas. Estos patrones corresponden a la cinética de crecimiento de las diferentes cepas, que puede variar un poco, llegando unas a fase estacionaria antes que otras de las cepas de estudio. Si bien, algunas de estas cepas muestran una elevada producción de celulosa lo que puede suponer un desprendimiento del biofilm debido a su posible unión lábil con la superficie como por ejemplo en *E. chiapanecum*, que muestra este comportamiento (mayor producción de celulosa, disminución de la formación de biofilms en el tiempo), tal y como también ocurre en mutantes superproductores de celulosa en *Rhizobium* (Robledo *et al*., 2012).

Además, uniendo estos datos con los datos del apartado anterior, se puede observar que no existe una relación directa entre la producción de celulosa y la formación de biofilms, aunque sí que hemos observado que la mayoría de cepas con mayor producción de celulosa tienen a las 24 horas su máximo en la formación de biofilms.

3. Evaluación de la implicación de la superproducción de celulasa CelC2 en la biosíntesis de celulosa y formación de biofilms.

Aunque las predicciones bioinformáticas y algunos datos bioquímicos confirmen que la estructura y expresión de esta celulasa de *E. medicae* WSM419 es similar a la ocurrida para la celulasa CelC2 en *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843, futuros estudios deben enfocarse en caracterizar tanto bioquímica como estructuralmente esta enzima, debido al interés que supone su implicación en la biosíntesis de celulosa, formación de biofilms y el fenotipo simbiótico *in planta*, como veremos en los apartados y capítulos siguientes de esta memoria de tesis doctoral.

Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron cómo una superprodución de celulasa CelC2 en diferentes cepas de *Rhizobium* conlleva una menor producción de celulosa y como consecuencia una menor formación de biofilms, debido a que la celulosa es uno de los componentes del biofilm bacteriano (Robledo *et al.,* 2012, Rivera *et al*., *in prep*).

Una vez obtenidos los derivados productores de celulasa rizobiana en *E. meliloti* 1021 y *E. medicae* WSM419, se realizaron ensayos de producción de celulosa y formación de biofilms de una manera similar a los realizados anteriormente.

En primer lugar, se realizaron ensayos de producción de celulosa en placa (figura 49), suplementando el medio de cultivo (YMA) con una concentración estandarizada de Rojo Congo.

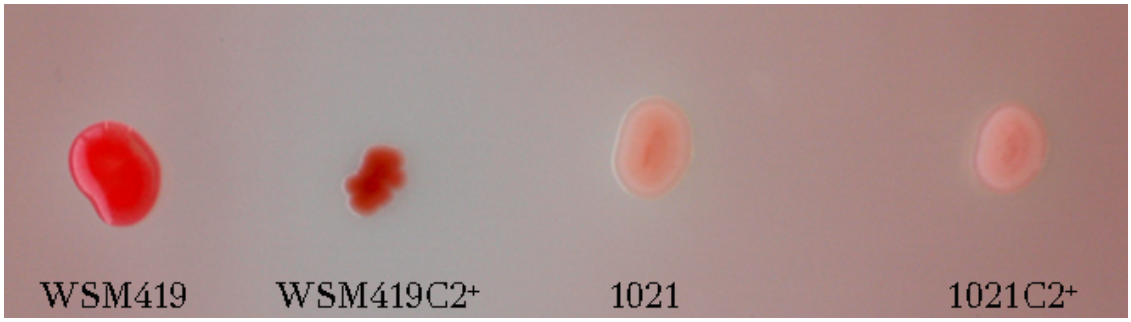


Figura 49. Colonias cultivadas en medio YMA suplementado con 25 mg/l de Rojo Congo de las cepas *E. medicae* WSM419, *E.meliloti* 1021 y sus cepas superproductoras de celulasa CelC2.

En el caso de *E. meliloti* 1021, estudios anteriores demuestran que esta cepa no es una buena formadora de biofilms y que tiene alterada la formación de exopolisacárido (Fujishige *et al*., 2006; Glazebrook and Walker, 1989), por lo que los resultados obtenidos serían concordantes con lo publicado en la literatura, ya que apenas muestra afinidad por el Rojo Congo. Además, en el apartado 2.1 ya avanzábamos la ausencia en la formación de celulosa de la cepa 1021 debido a su coloración blanquecina en medio sólido suplementado con Rojo Congo.

La cepa superporductora muestra una tonalidad similar a la cepa silvestre lo que no quiere decir que no afecte a la producción de celulosa, sino que bajo estas condiciones es imposible de discernir si en realidad está afectado en la producción de otro tipo de expolisacárido, por lo que, en un futuro, sería recomendable diseñar experimentos que lo confirmen. Además, se incluyó un control de transformación *empty vector* que se comportó de manera similar a la cepa silvestre y a su misma vez a la cepa superproductora, ya que no mostraba diferencias en la tonalidad debido a las razones expuestas anteriormente.

En el caso de la cepa WSM419 y como habíamos comprobado en el apartado 2. 1, la producción de celulosa es evidente. En un principio no podemos decir que la cepa WSM419C2$^+$ esté afectada en producción de celulosa ya que el color presentado por la colonia es bastante parecido, aunque debido a su morfología podemos pensar que pudiese estar afectada en la formación de otro polisacárido.

Si analizamos la capacidad formadora de biofilms de las cepas de *Ensifer* a estudio y sus derivados superproductores (figura 50), observamos que los datos concuerdan con los datos obtenidos para producción de celulosa en ambas especies.

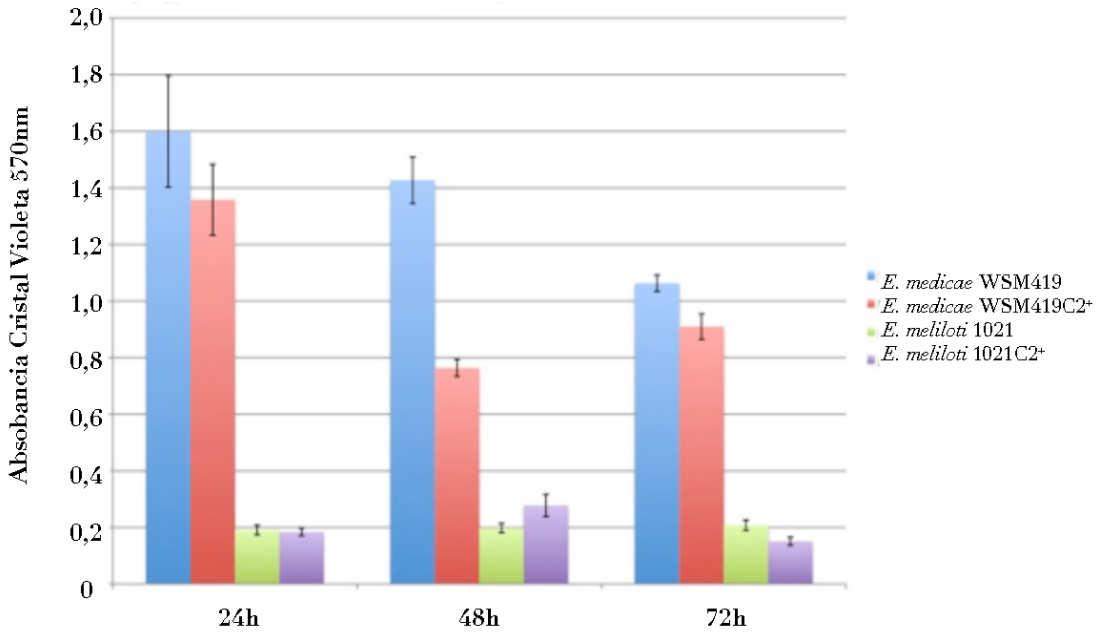


Figura 50. Ensayo de formación de biofilms en placas de polivinilcloruro de las distintas cepas de estudio y sus derivados superproductores de celulasa CelC2. El ensayo se realizó a distintos tiempos de crecimiento estático en medio rico suplementado con antibiótico cuando fué necesario. La capacidad de formación de biofilms de las especies de estudio se midió a 570 nm, después de una tinción con Cristal Violeta al 0,3%, resuspendiendo las películas bacterianas que se formaron en el fondo en una solución etanol:acetona 4:1. Antes de la medida del revelado se realizó una lectura a 595 nm para valorar el crecimiento y que no hubiese diferencias significativas entre ellas. Cada columna representa el valor medio de al menos 12 pocillos. Las barras de error representan el error estándar.

La formación de biofilms en la cepa 1021 y 1021C2$^+$ es mínima con respecto a la observada para las cepas WSM419 y WSM419C2$^+$, la cual es sustancialmente mayor. Los resultados obtenidos para cada una de las cepas de la misma especie no muestran diferencias estadísticamente significativas entre ellas para un $p \leq 0{,}05$ según el test LSD protegido de Fisher. La buena capacidad formadora de biofilms en *E. medicae* WSM419, unido a la producción de celulosa (+++, tabla 29), nos sugieren que dicha cepa será una excelente colonizadora de superficies bióticas, respecto a *E. meliloti* 1021.

Nuestras observaciones no pueden ser comparadas con las realizadas anteriormente en nuestro laboratorio con especies de *Rhizobium leguminosarum* al sobreexpresar el gen de la celulasa CelC2, ya que la disminución en formación de biofilms en el caso de *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843C2$^+$ fué estadísticamente significativa respecto de su cepa silvestre, lo que no ha

ocurrido en las correspondientes superproductoras en *Ensifer*, cuya disminución no ha resultado estadísticamente significativa. La celulasa CelC2 de *Rhizobium* expresada heterólogamente tanto en *E. medicae* WSM419 como en *E. meliloti* 1021 no parece intervenir en la biosíntesis de celulosa y en la formación de biofilms *in vitro* en el género *Ensifer*. No obstante, futuros estudios deben ser realizados para determinar el grado de especificidad de estas enzimas (celulasas) implicadas en la biosíntesis de celulosa bacteriana.

4. Evaluación de la implicación de la superproducción de celulasa CelC2 en la colonización de superficies radiculares.

En los apartados anteriores se observa cómo se comportan las cepas de estudio, tanto cepas silvestres como cepas que sobreexpresan este enzima en la producción de celulosa y en la formación de biofilms, es decir, cómo se comportan principalmente en la colonización de superficies abióticas.

Para obervar cómo se comportan las cepas en colonización de superficies bióticas, más concretamente, en la colonización de las superficies radiculares, realizamos inoculaciones de las diferentes cepas de *Ensifer*, *E. medicae* WSM419 y *E. meliloti* 1021 y sus derivados que sobreexpresan la celulasa rizobiana CelC2 en diferentes plantas, como son *Trifolium repens*, *Medicago sativa* y *Medicago truncatula.* Para ello, utilizamos las cepas mencionadas anteriormente marcadas con GFP (ver Materiales y Métodos), lo cual nos permite observar la colonización mediante microscopía de fluorescencia (figura 51). .

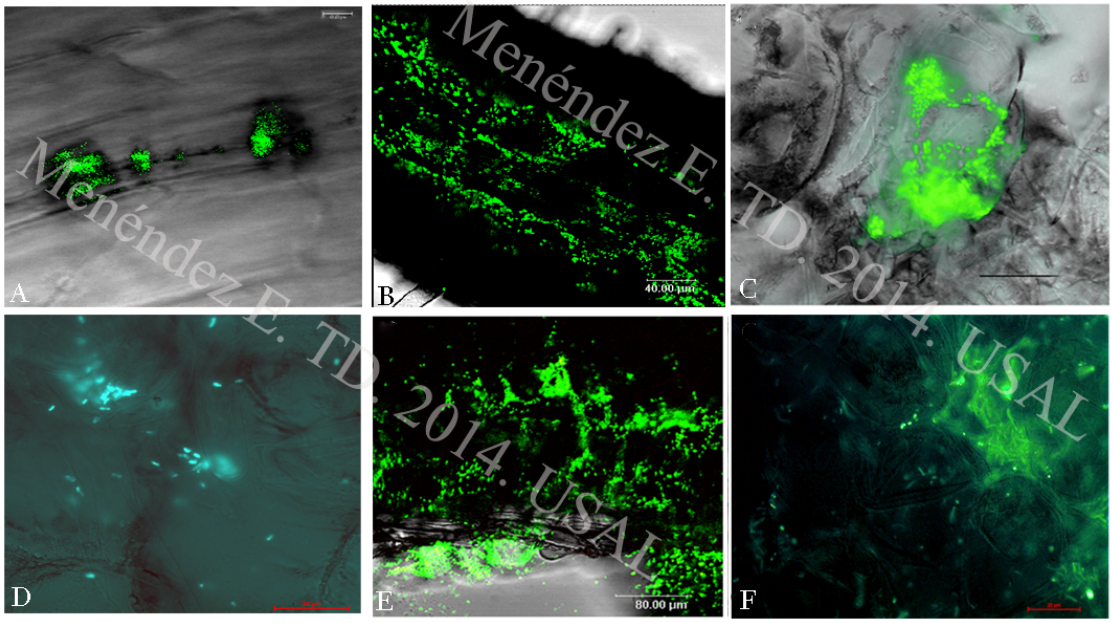


Figura 51. Micrografías de fluorescencia que muestran la colonización de superficies radiculares llevada a cabo por las distintas cepas de estudio en distintas plantas. Se

observa como *E. meliloti* 1021 coloniza normalmente la superficie de la raíz tanto de *M. sativa* (A) como *T. repens* (B). Este comportamiento es similar al de la cepa 1021C2$^+$ en M. sativa (D) y *T. repens* (E). En cuanto a la colonización de la superficie radicular de *M. truncatula* (C, F) de las cepas *E. medicae* WSM419 (C) y WSM419C2$^+$(F), el comportamiento es similar entre ellas y al de las cepas 1021 y 1021C2$^+$. El panel B está tomado de Robledo TD 2010.

Como podemos observar en todos los paneles de la composición realizada, todas las cepas son capaces de colonizar las superficies radiculares no existiendo diferencias apreciables en la forma de colonización entre las cepas silvestres y las cepas transformadas con el gen de la celulasa CelC2.

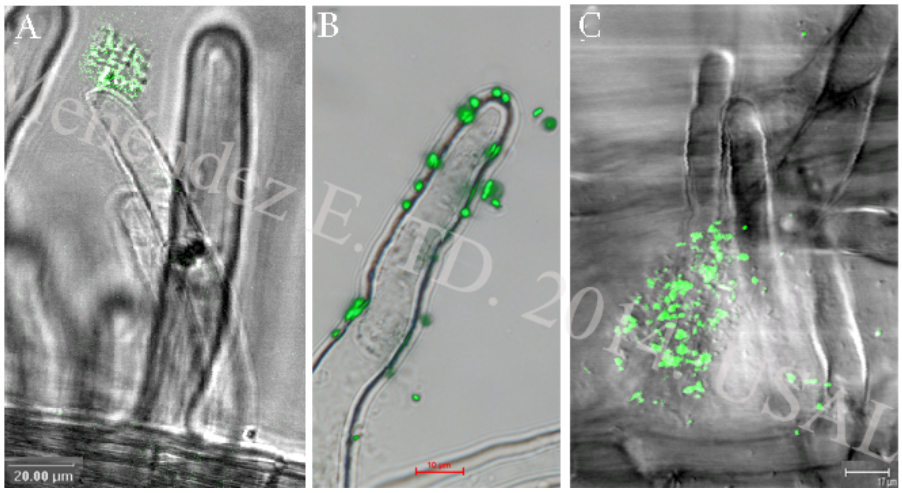


Figura 52. Micrografías de fluorescencia que muestran la colonización de pelos radiculares de *M. sativa* llevada a cabo por *E. meliloti* 1021 (A) y *E. meliloti* 1021C2$^+$ (B y C). *E. meliloti* 1021C2$^+$ no forma los típicos *caps* que forma *E. meliloti* 1021, si no que las bacterias se disponen alrededor del pelo radicular (B) o en la base (C).

Una vez que la bacteria ha llegado a colonizar la superficie de la raíz, comienza la formación del biofilm, que ayuda a dichas bacterias a establecerse y sobrevivir adheridas a la superficie radicular. Aunque, como hemos visto en los apartados 2. 1 y 3, la cepa 1021 no es buena formadora de biofilms ni produce una gran cantidad de celulosa sí que coloniza con normalidad las superficies radiculares, incluso de hospedores no específicos (trébol, figura 51 B), como podemos observar en los paneles A y B de la figura 51 e incluso formar *caps* (figura 52 A), paso previo de entrada al pelo radicular (ver apartado 6. 2 de la Introducción general). Además, la cepa 1021C2$^+$ presenta una colonización similar en la superficie radicular aunque, por el contrario, no forma los típicos *caps* en el ápice del pelo radicular como lo hace la cepa silvestre, sino que se distribuye alrededor del pelo radicular (figura 52 B) y en su base (figura 52 C). La deficiencia que la propia cepa 1021 tiene en formación de exopolisacárido hace que las posibles diferencias que podamos encontrar entre estas dos cepas, la silvestre y la derivada productora de CelC2, pasen desapercibidas como hemos podido comprobar en los apartados

celulosa y formación de biofilms *in vitro*, en la que observamos efectos subóptimos, con lo cual, la hipótesis de la existencia de un posible inductor por parte de la planta cobra relevancia.

Además, si bien *E. meliloti* 1021 no es endosimbionte compatible con trébol, observamos cómo también existe colonización en la superficie radicular de dicha planta, por lo que se puede decir que esta cepa tiene un comportamiento similar en cuanto a la colonización de la raíz de diferentes plantas, por lo que podría actuar como endófito al menos en esta planta. Numerosos estudios han demostrado cómo endosimbiontes de leguminosas pueden actuar también como endófitos en diversas plantas tanto leguminosas como no leguminosas, por ejemplo hortícolas y cereales (Chabot *et al*., 1996; Yanni *et al.,* 2001; García-Fraile *et al*., 2012; Flores-Félix *et al*., 2013), demostrándose que la colonización y adhesión bacteriana a las superficies radiculares es independiente de si posteriormente existe o no una interacción simbiótica intra/intercelular, hecho aceptado en la comunidad científica.

La cepa *E. medicae* WSM419, como hemos comprobado anteriormente en este capítulo, es una buena formadora de biofilms en superficies abióticas y además, posee una alta producción de celulosa, como se pone de manifiesto en los ensayos en placa (figura 47 y tabla 29). En la superficie radicular, dicha cepa coloniza con normalidad, formando estructuras tridimensionales típicas (figura 51 C). Además, no existen diferencias sustanciales respecto a su derivado superproductor WSM419C2^{+}, el cual coloniza de similar manera la superficie de la raíz, formando similares estructuras a las de la cepa silvestre (figura 51 F). Estas observaciones no coinciden con las observaciones publicadas por Robledo y colaboradores en 2012 en *Rhizobium*, en el cual una sobreexpresión de la celulasa CelC2 conlleva una alteración en la colonización de superficies respecto de la cepa silvestre, una disminución significativa en la formación de biofilms y una ausencia de coloración en los ensayos cualitativos en Rojo Congo, la cual refleja la ausencia de celulosa. En base a nuestros datos, la expresión heteróloga de la celulasa CelC2 de *Rhizobium* no afecta a la colonización por parte de las cepas probadas del género *Ensifer* en ninguno de los hospedadores, sean o no sean hospedadores específicos, por lo que podemos decir que dicho enzima es al menos específico de género en la biosíntesis de celulosa.

Debido a estas observaciones, en el siguiente capítulo de esta tesis doctoral se evaluará el efecto de la expresión heteróloga de la celulasa CelC2 de *Rhizobium* en *Ensifer meliloti* 1021 en el siguiente paso de la interacción simbiótica rhizobia leguminosa, es decir, la infección primaria.

CAPÍTULO 3

Efecto de la expresión heteróloga de la celulasa CelC2 en la infección primaria en *Ensifer* y sus hospedadores homólogos (*Medicago sativa* y *Medicago truncatula*) y heterólogos (*Trifolium repens*).

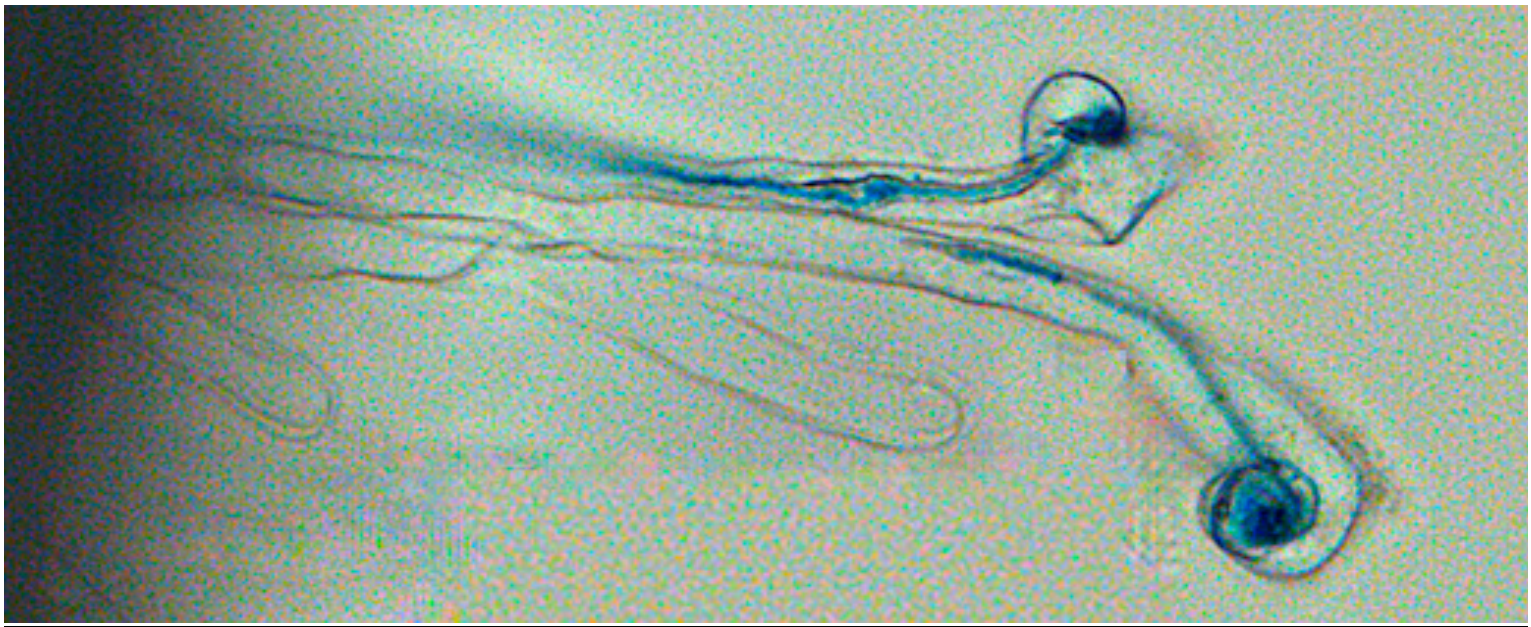


Imagen: Curlings en pelos radiculares de *M. truncatula* inoculada con *E. meliloti* 1021 lacZ.

1. Introducción

Recientemente se ha descrito en nuestro grupo de investigación cómo la celulasa CelC2 producida por la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii ANU843, juega un papel crucial en el proceso de infección primaria en su hospedador específico *Trifolium repens* o trébol blanco (Robledo *et al*., 2008).

Como se describe en el primer capítulo, la proteína CelC2 es una endoglucanasa de la familia 8 de las glicosil hidrolasas. Esta enzima posee una alta especificidad de sustrato para la celulosa no cristalina que se localiza únicamente en el ápice de los pelos radiculares en crecimiento (figura 53 B, flecha).

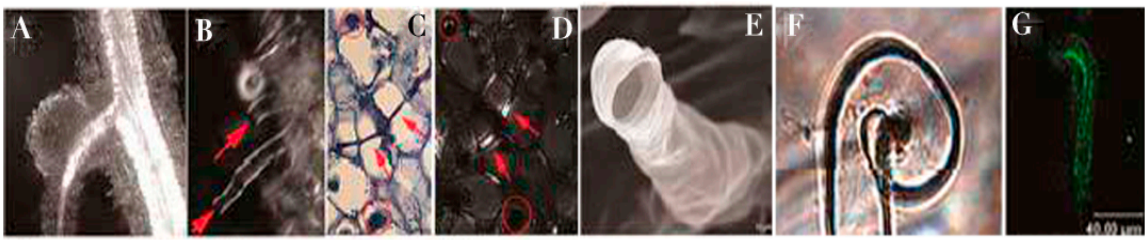


Figura 53. Distribución de la celulosa no cristalina en las raíces de *Trifolium repens* y eventos relacionados con la infección primaria. A) Estructura de celulosa cristalina de la raíz y nódulos de trébol blanco, B) de los pelos radicales, observándose como el ápice y el final del canal de infección (C, D) no presentan refringencia, es decir, no están formados de celulosa cristalina. En el ápice del pelo radicular se pueden observar los eventos en infección primaria, como el fenotipo HoT (E), curlings (F) y la formación de canales de infección (G). Los paneles A, B y D fueron tomados mediante microscopía de luz polarizada, los paneles C y F mediante microscopía óptica, el panel E mediante microscopía electrónica y finalmente el panel G se obtuvo mediante microscopía de fluorescencia (imagen modificada de Robledo *et al*., 2011).

Una vez conocida la secuencia del gen que codifica para la celulasa CelC2, se confirmó mediante mutantes knock-out que el proceso de infección intracelular se ve afectado, bloqueándose la entrada del microsimbionte, la síntesis de los canales de infección y produciéndose un gran número de nódulos inefectivos (Robledo *et al.,* 2008). Además, la sobreexpresión de la celulasa CelC2 resultó en un incremento en la actividad carboximetilcelulásica respecto a la cepa salvaje, por lo que se produce una hidrólisis extensiva en las zonas donde se localiza la celulosa no cristalina, el ápice de los pelos radiculares (figura 53 B) y también al final del canal de infección (figura 53 C, D). Debido a esta hidrólisis muy localizada, los nódulos de las plantas inoculadas con la cepa superproductora muestran el interior desorganizado y son, en su mayor parte, inefectivos (Robledo *et al*., 2011).

Además, el desarrollo de plantas de trébol blanco inoculadas con este mutante superproductor es menor respecto a las plantas inoculadas con la cepa salvaje, tanto en condiciones axénicas en laboratorio, como en condiciones controladas de invernadero (Robledo *et al*., 2011)

Los resultados obtenidos por Robledo y colaboradores tanto en 2008 como en 2011, muestran que la celulasa CelC2 puede estar implicada no sólo en la infección primaria sino también en la infección secundaria de la interacción simbiótica *Rhizobium-Trifolium* y que la regulación equilibrada de su expresión es clave en el establecimiento de una relación efectiva entre ambos.

Con el objetivo de conocer mejor la función de esta celulasa, en esta tesis doctoral, se diseñaron ensayos en otros sistemas simbióticos conocidos, como el sistema *Ensifer-Medicago*. Este sistema es un modelo ampliamente utilizado en estudios simbióticos y del que en la actualidad se dispone de todo tipo de herramientas genéticas para su estudio. En este sistema modelo se utiliza la cepa 1021 de *Ensifer meliloti* como endosimbionte, de la cual su replicoma está disponible en su totalidad (Galibert *et al*., 2001), siendo además ideal para nuestros estudios debido a que no contiene el gen que codifica para la celulasa CelC2. Además, es capaz de establecer una relación simbiótica con especies del género *Medicago*, siendo *M. sativa* su hospedador habitual, aunque también se utiliza *M. truncatula* como modelo, por la gran cantidad de herramientas disponibles para el estudio de todas las etapas del establecimiento de una simbiosis fijadora de Nitrógeno.

Así, nos propusimos estudiar cómo esta celulasa, esencial en la infección primaria en el sistema *Rhizobium-Trifolium,* puede estar implicada en infección primaria en otros sistemas simbióticos y además, determinar su grado de especificidad.

2. Implicación de la celulasa CelC2 en infección primaria en *Medicago sativa*.

Como hemos descrito en el capítulo anterior, el gen *celC*, que codifica para la celulasa CelC2, está muy conservado y ampliamente distribuido en el género *Rhizobium* y géneros relaccionados, con porcentajes de similitud que varían entre 99.9% y 70 %. También está presente en otros géneros de bacterias como *Gluconacetobacter, Pseudomonas* y *Escherichia*. Este gen está localizado cerca de genes que codifican para una celulosa sintasa, en una región implicada en la biosíntesis de celulosa bacteriana, el operón *celABC* o *bcsABZ* (Matthysse *et al*., 1995; Ausmees *et al*., 1999). En todas las cepas en que está disponible la secuencia del gen *celC*, éste se ha localizado en el cromosoma bacteriano a excepción de especies del género *Ensifer*, como son *E. medicae* WSM419 y las cepas NGR234, HH103, USDA257 de *E. fredii* y GR4 de

E. meliloti, que contienen los homólogos al gen *celC* y a los otros genes del operón *celABC* en plásmidos simbióticos.

Con el fin de analizar el efecto de la endoglucanasa CelC2 en hospedadores no específicos, se introdujo el gen *celC*, que codifica para dicha enzima, en la cepa *E. meliloti* 1021, la cual es capaz de infectar y nodular diversas especies del género *Medicago* pero no plantas del género *Trifolium* y que, además, no contiene homólogos a la celulasa CelC2 en su genoma, obteniéndose de esta manera un mutante que expresa de forma heteróloga este enzima. Seguidamente, se monitorizó su fenotipo simbiótico en *M. sativa* (alfalfa).

Para la observación de los diferentes eventos ocurridos durante la infección, se llevaron a cabo ensayos de infección a diferentes días post-inoculación y se observaron al microscopio óptico, microscopio de fluorescencia y cuando fué necesario, mediante microscopía confocal. Estos ensayos se llevaron a cabo en placas con medio Fähraeus sin fuente de Nitrógeno, con semillas de alfalfa, esterilizadas en superficie e inoculadas con *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843, *E. meliloti* 1021 y sus derivados sobreexpresores de la celulasa CelC2. Además, se incluyeron en todos los ensayos controles "*empty vector*" (EV). En paralelo, se realizaron ensayos utilizando dichas cepas marcadas con GFP.

Las plantas inoculadas se cultivaron durante 20 días en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad, en cámaras de cultivo o fitotrones, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Para los ensayos en los que las plantas fueron inoculadas con las cepas marcadas con GFP la metodología fué la misma y fueron monitorizados a distintos tiempos post-inoculación, con el fin de controlar todas las etapas de la simbiosis.

Una vez transcurrido el tiempo determinado, pudimos observar los fenotipos que ocurren cuando dicha celulasa es sobreexpresada tanto homóloga como heterólogamente en las dos cepas de estudio e inoculadas en una planta que no es su hospedador específico, como es *Medicago sativa* (figura 54). Las observaciones realizadas para este caso se comprobaron mediante recuentos numéricos de los pelos radiculares que presentan los fenotipos de cada cada uno de los eventos que ocurren en infección primaria, es decir, Had/Hac (*Hair deformation and Hair curling*), HoT (*Hole on the Tip*) y RaT (*Redirections at the Tip*). Los recuentos se realizaron por centímetro de raíz y se muestran en la tabla 30.

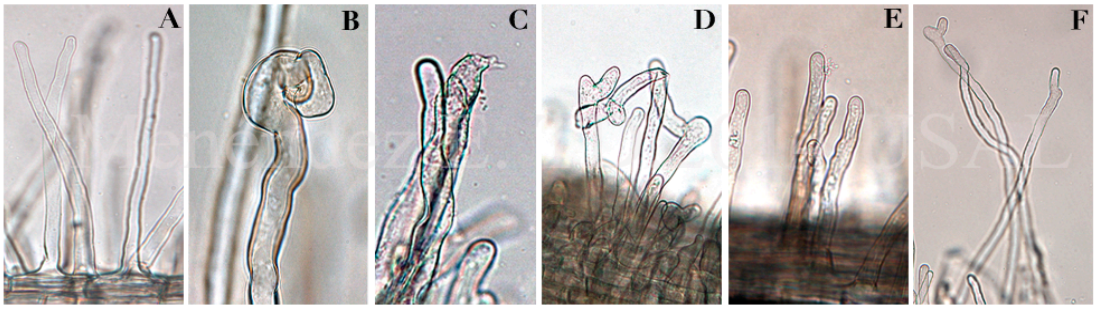


Figura 54. Microscopía óptica de pelos radiculares de alfalfa inoculados con *E. meliloti* 1021 (B, C), *E. meliloti* 1021C2$^+$ (D), ANU843 (E) y ANU843C2$^+$ (F), además de su control sin inocular (A). Las imágenes D (*Em* 1021C2$^+$) y F (*Rlt* ANU843C2$^+$) muestran la formación de redirecciones en los pelos radiculares (RaT) de *M. sativa* producidas por la sobreexpresión de la celulasa CelC2.

Tabla 30. Fenotipos simbióticos observados en raíces de *M. sativa* a los 20 días post-inoculación con las cepas 1021, ANU843 y sus derivados CelC2$^+$, cuyas combinaciones se analizaron por separado. Los valores muestran la media y el error estándar de al menos 6 plantas por ensayo para cada uno de los fenotipos (Had/Hac (*Hair deformation and Hair curling*), HoT (*Hole on the Tip*) y RaT (*Redirections at the Tip*)). Los resultados se muestran como la media ± el error estándar. Valores seguidos de diferente letra son estadísticamente significativos (Test de Fisher p≤0,05).

	Had+Hac/cm	**HoT/cm**	**RaT/cm**
Control	0,00±0,00 a	0,32±0,04 a	1,477±0,283 a
Em1021	1,918±0,164 b	1,957±0,48 a	1,377±0,555 a
Em1021C2$^+$	1,915±0,085 b	1,477±0,147 a	5,287±0,615 b
Control	0,00±0,00 a	0,32±0,04 a	1,477±0,283 a
ANU843	0,00±0,00 a	2,667±0,441 b	4,533±0,533 a
ANU843C2$^+$	0,00±0,00 a	2,107±0,452 b	9,54±0,436 b

Las observaciones realizadas en las raíces de alfalfa inoculadas con la cepa salvaje muestran que en los pelos radiculares se forman las estructuras típicas esperadas de la infección con un rizobio compatible, es decir, "HoT" (figura 54 C), "caps", curlings (figura 54 B) y canales de infección típicos. Las plantas inoculadas con la cepa 1021EV mostraron, en los pelos radiculares, el mismo fenotipo que las inoculadas con la cepa salvaje. Mientras tanto, en las raíces inoculadas con el derivado que expresa la celulasa CelC2 (1021C2$^+$), encontramos tanto estas estructuras típicas descritas en el párrafo anterior

encontramos tanto estas estructuras típicas descritas en el párrafo anterior como otras que no se corresponden con una infección normal. Observamos que se producen redirecciones polares en gran número repecto a raíces de plantas inoculadas con la cepa salvaje y en el control sin inocular (figura 54 D).

En el caso de las raíces de alfalfa inoculadas con ANU843 se pueden observar algunas bacterias adheridas en la punta de los pelos radicales (figura 54 E), al igual que ocurre con su hospedador específico, aunque es un evento muy poco frecuente. Al igual que al ser inculadas con la cepa 1021C2$^+$, en el caso de la inoculación con la cepa ANU843C2$^+$, también se puede observar un aumento en el número de redirecciones polares en ambas plantas inoculadas con la cepa superproductora (figura 54 F).

Los datos numéricos obtenidos nos muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas en el número de "curlings" observados y contabilizados en las plantas inoculadas con las cepas 1021 y 1021C2$^+$ ni tampoco en el número de pelos decapitados. Las diferencias más evidentes se observan en el contaje del número de redirecciones polares, mostrándose un incremento estadísticamente significativo de dicho número respecto a los contajes realizados en las plantas control y en las plantas inoculadas con la cepa salvaje.

Por otro lado, estos datos nos muestran como las cepas ANU843 y ANU843C2$^+$, aunque sean capaces de colonizar y formar biofilms, no son capaces de formar curlings en *M. sativa*, lo cual era esperado, ya que no es su hospedador homólogo. Aún así, contabilizamos un número significativamente mayor de pelos decapitados en las raíces inoculadas respecto de las raíces control. En un principio se puede pensar que este incremento puede ser debido a daño mecánico, por la pérdida de turgencia de la célula al separar la raíz de su soporte inicial y posterior montaje y visualización al microscopio. Este razonamiento no es probable puesto que la manipulación es igual en ambos casos. Sin embargo, este incremento en el número de HoT en plantas inoculadas puede ser debido a que las paredes celulares de los pelos estén debilitadas y se rompan más facilmente que en el caso de las paredes celulares de los pelos radiculares de las plantas control sin inocular. En este sentido, Dazzo y colaboradores describieron en 1996 que los factores de nodulación inducían una disrupción localizada en la cristalización natural de la pared de los pelos radicales (Dazzo *et al*., 1996). De cualquier manera, este incremento no es debido a la celulasa CelC2 ni a su sobreexpresión ya que, en ambos casos (*E. meliloti* y *R. leguminosarum*), el número de HoT es inferior en las cepas transformadas con respecto a las cepas salvajes.

Un posible destino de estos pelos decapitados es que puedan seguir a posteriori su crecimiento formando una redirección polar. El número de RaT por cm de raíz encontrado es significativamente superior en las raíces inoculadas con la cepa superproductora respecto a las plantas control y a las plantas inoculadas con la cepa ANU843, cuyo número de RaT también es

superior, aunque no es significativo respecto al control. No se han llegado a visualizar en estas plantas ningún inicio de nodulación (noi), aunque en raras y contadas ocasiones se ha podido observar al formación de nódulos en plantas de *M. sativa*, aunque estos nódulos no poseían un aspecto de nódulo funcional (figura 55).

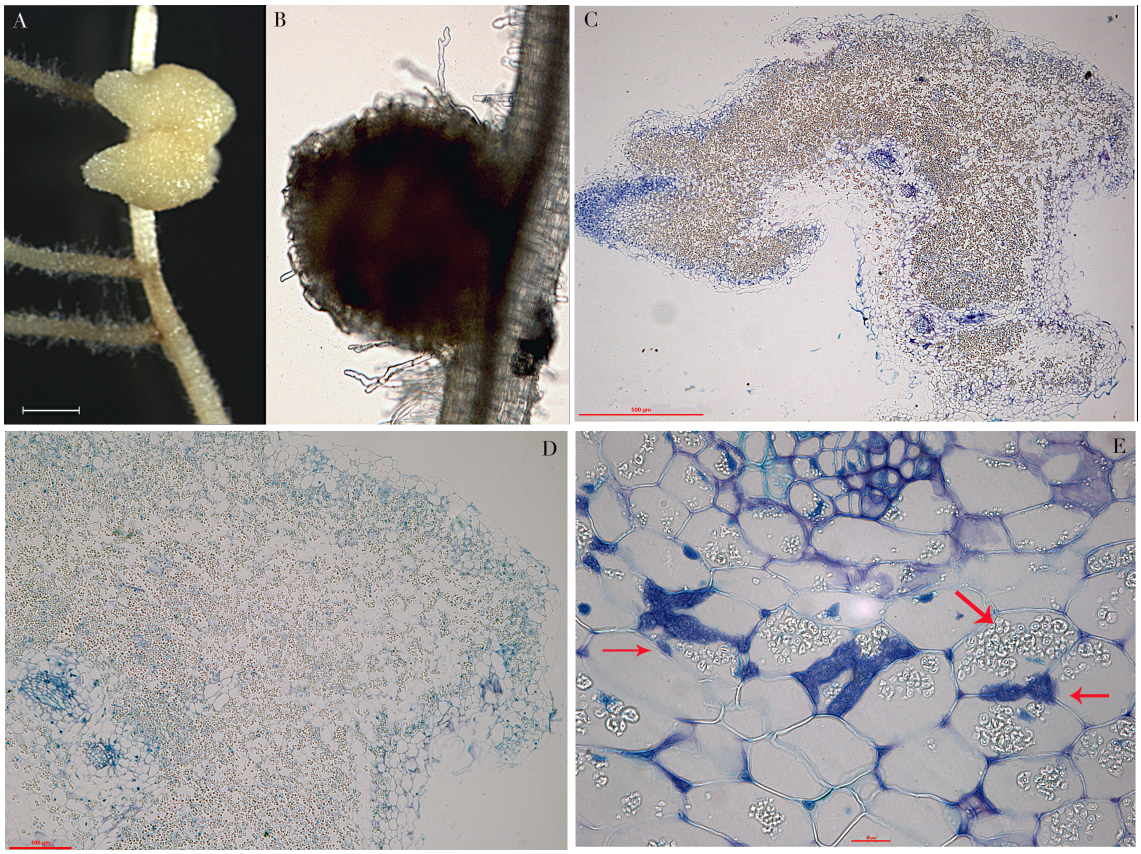


Figura 55. Morfología (A, B) y cortes histológicos (C, D, E) de nódulos espontáneos encontrados en raíces de *M. sativa* inoculadas con ANU843C2^{+}. El interior de estos nódulos no se encuentra ocupado por los típicos simbiosomas (C, D), sino que existen cuerpos refringentes que podrían ser gránulos de almidón y algunas zonas presentan infección intercelular (E).

Estos nódulos, de morfología aberrante (figura 55 A), no se encuentran ocupados, no poseen la típica disposición de un nódulo fijador de Nitrógeno. Dichos nódulos poseen una disposición atípica, no pudiéndose identificar con claridad las zonas de las que se compone un nódulo (figura 55 B, D). Existen acúmulos de lo que podrían ser gránulos de almidón, ya que son refringentes por lo que podrían servir a la planta de estructuras de reserva (figura 55 D, E). Si bien no hay formación de simbiosomas, existe infección intercelular por parte del rizobio (figura 55 E).

3. Implicación de la expresión heteróloga de la celulasa CelC2 en infección primaria en *Trifolium repens*.

Los ensayos de infección primaria realizados en trébol se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones aplicadas en *M. sativa* (figura 56), incluyendo los recuentos de los pelos radiculares que presentaban los fenotipos anteriormente descritos (tabla 31).

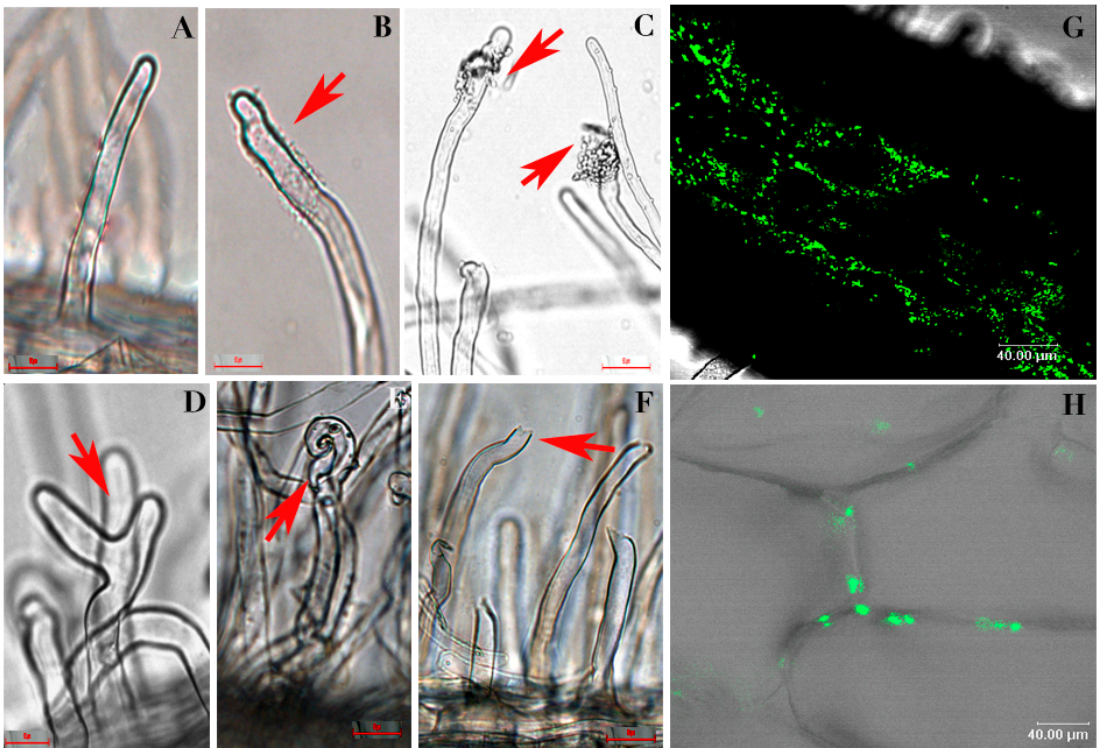


Figura 56. Microscopía óptica (A-F) y confocal (G,H) de pelos radiculares de trébol inoculados con *E. meliloti* 1021 (B), *E. meliloti* 1021C2^{+} (C, D), ANU843 (E) y ANU843C2^{+} (F), además de su control sin inocular (A). Las imágenes G y H muestran el comportamiento como endófito que tiene la cepa 1021 en raíces de trébol, colocándose en los espacios intercelulares de las raíces. Las flechas señalan los eventos característicos de cada interacción.

Tabla 31. Fenotipos simbióticos observados en raíces de *T. repens* a los 20 días post-inoculación con las cepas 1021 y 1021C2$^+$. Los valores muestran la media y el error estándar de al menos 6 plantas por ensayo para cada uno de los fenotipos (Had/Hac (*Hair deformation and Hair curling*), HoT (*Hole on the Tip*) y RaT (*Redirections at the Tip*)). Los valores se muestran como la media ± error estándar. Valores seguidos de diferente letra son estadísticamente significativos (Test de Fisher p≤0,05).

	Hac/cm	**Hot/cm**	**Rat/cm**
Control	0,00±0,00 a	1,715±0,285 a	1,43±0,57 a
Em1021	0,00±0,00 a	4,22±0,22 a	3,413±0,517 a
Em1021C2$^+$	0,00±0,00 a	9,285±1,285 b	9,493±1,781 b

Las observaciones realizadas en las raíces de trébol inoculadas con la cepa 1021 muestran que, al no ser su hospedador específico, no es capaz de formar curlings ni canales de infección pero sí se adhiere al pelo radicular, aunque de forma uniforme (figura 56 B), ocupando toda la superficie de la raíz y, en determinadas ocasiones, puede infectar intercelularmente (figura 56 G, H), por lo que podríamos decir que dicha cepa se comporta como endófito en hospedadores no específicos o al menos en trébol blanco. Sin embargo, en algunos pelos radicales de plantas inoculadas con el derivado superproductor, se observaron pelos radicales rotos en la punta del pelo radicular en desarrollo. El hecho de que aparezcan estos pelos rotos puede deberse a la hidrólisis del ápice del pelo, debido a la especificidad de hospedador que muestra la celulasa CelC2. Esta especificidad que se da en infección primaria, formándose el fenotipo HoT, infectántose las plantas de trébol y de alfalfa por sus cepas homólogas y no al contrario, demuestra lo que Mateos y colaboradores reportaban cuando, aplicando celulasa CelC2 purificada directamente en pelos de alfalfa, no se obtenía fenotipo HoT, como sí que lo obtenían en trébol (Mateos *et al*., 2001; Robledo *et al*., 2008).

Los datos obtenidos en los recuentos confirman que la cepa 1021 coloniza y formar biofilms sobre la raíz de trébol, pero no es capaz de entrar mediante la formación del cayado de pastor o "*curling*" y canales de infección en los pelos radiculares. Sin embargo, el número de pelos decapitados en las plantas inoculadas con la cepa 1021C2$^+$ es significativamente superior al de las plantas inoculadas con la cepa 1021 y las plantas control. Este aumento puede ser debido a que la celulasa CelC2, aunque expresada heterólogamente por un rizobio no compatible y que además, no la posee en su genoma, muestra afinidad por la celulosa no cristalina situada en el ápice de los pelos radiculares de trébol, su planta homóloga. Estos datos confirman la

especificidad de hospedador de la celulasa rizobiana CelC2. Además, en estos ensayos de infección, también observamos redirecciones polares en condiciones nativas, aunque estas redirecciones polares (fenotipo RaT) aumentan en un número significativamente mayor en las raíces de trébol inoculadas con la cepa 1021C2$^+$, concordando así con los resultados observados en *M. sativa*.

Adicionalmente, se realizaron los recuentos correspondientes a los fenotipos encontrados en los pelos de las raíces de trébol inoculadas con las cepas ANU843 y ANU843C2$^+$. Los datos obtenidos concuerdan con los datos publicados por Robledo y colaboradores, encontrándose una disminución de Had/Hac y un aumento de HoT, ambos significativos, en los pelos inoculados con la cepa que sobreexpresa la celulasa CelC2 (Robledo *et al.*, 2011). Además, existe un aumento significativo del fenotipo RaT, que en este estudio anterior no fué descrito, pero sí observado. Los datos obtenidos en este trabajo corroboran dicho aumento significativo (tabla 32).

Tabla 32. Fenotipo simbiótico RaT observado en raíces de *T. repens* a los 20 días post-inoculación con las cepas ANU843 y ANU843C2$^+$. Los valores muestran la media y el error estándar de al menos 6 plantas por ensayo. Los valores se muestran como la media ± error estándar. Valores seguidos de diferente letra son estadísticamente significativos (Test de Fisher $p \leq 0,05$).

	RaT/cm
Control	1,43 ± 0,57 a
ANU843	1,66 ± 0,335 a
ANU843C2$^+$	13,8 ± 3,43 b

En resumen, las cepas superproductoras de CelC2 mostraron diferencias relevantes con las cepas salvajes, sobre todo en el número de deformaciones en los pelos radiculares (redirecciones polares) en ambas plantas probadas, *Medicago sativa* y *Trifolium repens*. Este hecho sugiere que este efecto producido por la celulasa CelC2 es independiente de Factores de Nodulación, ya que independientemente de si utilizamos la planta hospedadora o la planta no hospedadora, cuando éstas están inoculadas con una cepa sobreexpresora de dicha celulasa, se da el fenotipo RaT. En la literatura se ha comprobado que al adicionar factores de nodulación purificados directamente sobre la pared del pelo radicular, se inducía un cambio en la pared celular formándose una redirección (Weerasinghe *et al.*, 2003). El fenotipo RaT comprende sólamente las redirecciones en la punta del pelo radicular, que podemos explicar como respuesta a la agresión que supone la degradación del ápice del pelo producido por la celulasa CelC2 y/o como

una respuesta de defensa de la planta al "sentir" el desequilibrio en la acción de dicha celulasa.

4. Implicación de la celulasa CelC2 en infección primaria en *Medicago truncatula*.

En el apartado anterior, se describe el fenotipo en infección primaria producido por mutantes superproductores de celulasa CelC2 de las cepas *E. meliloti* 1021 y *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843 en plantas de *Medicago sativa* (alfalfa) y en plantas de *Trifolium repens* o trébol blanco (Robledo *et al*, 2011; Robledo, M. TD 2010; Menéndez *et al*., *in prep*). Debido a que existen multitud de herramientas genéticas, se decidió utilizar la leguminosa modelo *M. truncatula* para analizar los fenotipos producidos en infección primaria, infección secundaria, nodulación y desarrollo vegetal, cuando se expresa heterólogamente esta celulasa CelC2 en la cepa *E. meliloti* 1021.

Se llevaron a cabo ensayos de infección (ver Materiales y Métodos) en placa para comparar la infección en raíces de *Medicago truncatula* con las cepas 1021 y 1021C2^{+}, respectivamente marcadas con un plásmido que expresa el gen *lacz* (Teeri *et al*., 1989), como se describe en el apartado de materiales y métodos. Las distintas etapas iniciales del proceso de infección fueron monitorizadas mediante microscopia óptica a los 3 y 6 días post inoculación, siendo las medidas a los 6 días post inoculación las más adecuadas en nuestro caso, aunque en las medidas realizadas a los 3 días ya se comenzaban a notar diferencias en los fenotipos que ocurren en la etapa de infección primaria.

En cuanto a la capacidad de colonización y adhesión de dichas cepas a la raíz, podemos observar que la cepa 1021 coloniza y se adhiere a la raíz de una forma normal, formando los típicos biofilms y las estructuras en forma de "cap" en la punta de los pelos radicales (Figura 54 C). Si bien, esta cepa no es muy buena formadora de biofilms en comparación con otras cepas de *Ensifer* y *Rhizobium* (Fujishige *et al*., 2006), ya que es deficiente en formación de exopolisacáridos (Glazebrook and Walker, 1989), los cuales son importantes en la colonización y formación de biofilms en general (Matsukawa y Greenberg, 2004) (ver colonización en el Capítulo 2).

Al inocular con la cepa 1021C2^{+}, superproductora de celulasa CelC2, podemos observar cómo también coloniza y se adhiere, pero lo hace en la base de los pelos radicales y sin la formación de estructuras típicas en el ápice de los mismos (figura 56 G). Además, en las plantas inoculadas con la cepa que sobreexpresa la celulasa CelC2, se observa un incremento de las deformaciones y ramificaciones o redirecciones polares en los pelos radicales, respecto a lo observado en plantas inoculadas con la cepa salvaje. Las ramificaciones observadas que parten del centro o la base de los pelos radicales son similares a las que experimenta un pelo al que se le han

inyectado factores de nodulación purificados directamente en su pared celular (Weerasinghe *et al*., 2003). Las redirecciones que experimentan los pelos en su ápice pueden ser debidas a una reacción de defensa de la planta frente a la agresión llevada a cabo por la sobreproducción de celulasa CelC2 (figura 57).

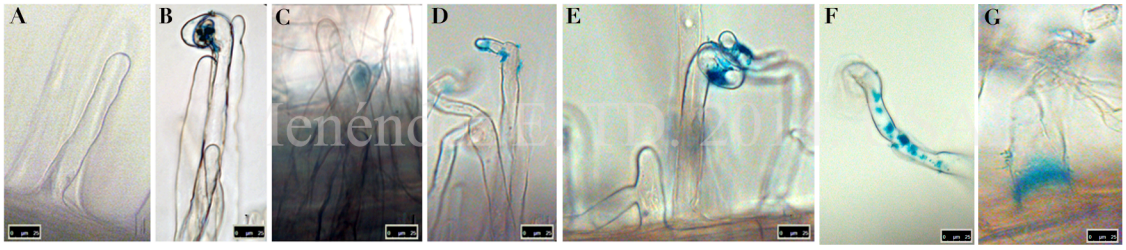


Figura 57. Micrografías de pelos radicales en raíces de *Medicago truncatula* inoculadas con *E. meliloti* 1021 (B, C) y *E. meliloti* 1021C2^{+} (D-G), ambas marcadas con *lacZ*. En el control sin inocular (A) los pelos suelen estar intactos. *E. meliloti* 1021 coloniza la superficie de la raíz y produce las típicas estructuras, como "caps" (C), "curlings" y canales de infección (B). *E. meliloti* 1021C2^{+} muestra un aumento en el número de pelos radicales con redirecciones (D), como también infecta, formando un tipo de curling aberrante o desorganizado (E). Además no forma caps, si no que se distribuye alrededor del pelo (F) o en su base (G).

En estos ensayos se pudo observar cómo la cepa silvestre es capaz de adherirse a la punta de los pelos formando el "cap" (figura 57 C, D) e inducir en ellos la deformación típica que conduce al desarrollo del cayado de pastor y al "curling" (figura 57 B). Este fenotipo normal también se observa tras la inoculación con la cepa 1021C2^{+}, pero además existe alguna alteración o diferencia en la síntesis de la pared celular por parte de la planta que hace que la degradación producida por la sobreexpresión de la celulasa CelC2, es decir, el fenotipo HoT, no sea tan fuerte, o al menos no tan fuerte como ocurre en la relación *Trifolium – Rhizobium* (Robledo *et al.*, 2011). Aunque la cantidad de celulasa producida por la cepa 1021C2^{+} es superior a la producida por la cepa ANU843C2^{+}, no es suficiente para la producción del fenotipo HoT, lo que confirma la especificidad que posee dicha celulasa por los pelos de *Trifolium*. Aun así, aparecen "curlings" que son irregulares y/o aberrantes, en un número inferior a los producidos por la cepa salvaje, tal y como ocurre en *T. repens* inoculado con las cepas ANU843 y ANU843C2^{+} (figura 57 E) (Robledo *et al*., 2011). Además, como mostraban los datos en alfalfa y trébol inoculados con cepas superproductoras de CelC2, aquí también podemos observar con mucha frecuencia un mayor número de redirecciones polares (tabla 33).

Tabla 33. Fenotipos en infección primaria en plantas de *Medicago truncatula*. Se muestran los valores medios representativos de tres ensayos independientes de al menos 5 plantas cada uno y 6 días post-inoculación. Los resultados se muestran como la media ± el error estándar. Valores seguidos de un asterisco son significativos (Test de Fisher p≤0,01).

	Hac/cm	**HoT/cm**	**RaT/cm**
Control	0,00 ± 0,00	0,39 ± 0,142	0,43 ± 0,082
Em1021	1,45 ± 0,653	0,33 ± 0,053	0,71 ± 0,109
Em1021C2⁺	0,35 ± 0,112	1,79 ± 0,758	2,93 ± 0,434 *

Los datos nos muestran un aumento estadísticamente significativo en el número de redirecciones polares, que es 6 veces superior al valor presentado en las plantas inoculadas con la cepa salvaje.

Estos resultados son similares a los resultados obtenidos en los apartados anteriores con *Trifolium repens* y *Medicago sativa*, confirmando así que el aumento del número de redirecciones polares es debido a la acción de la celulasa CelC2.

Para comprobar que la acción de la celulasa CelC2 es independiente de Factores de Nodulación como sugieren los datos del primer apartado, se realizaron ensayos de infección con las cepas 1021 y 1021C2⁺ marcadas con *lacZ* en mutantes *nfp1* de *M. truncatula* (Ben Amor *et al*., 2003), mutante afectado en las primeras etapas de la infección primaria, observándose los fenotipos mostrados por los pelos radicales en el microscopio óptico a los 6 días post-inoculación (figura 58).

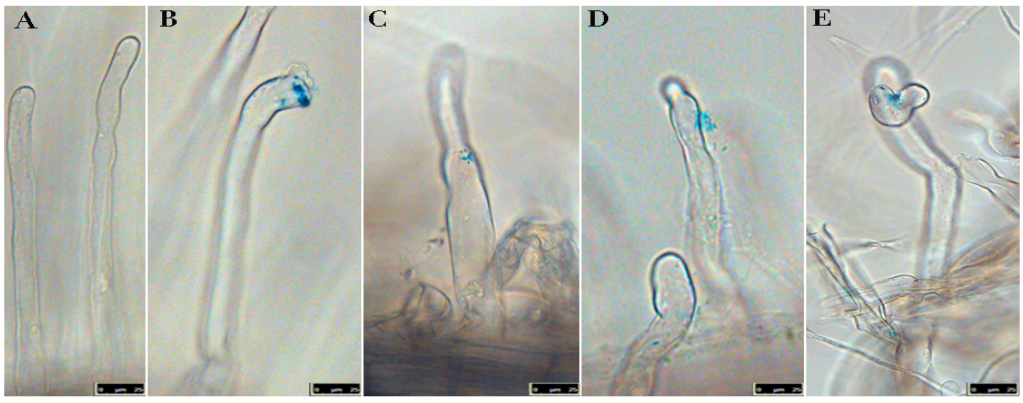


Figura 58. Micrografías de pelos radicales en raíces de *Medicago truncatula nfp1* 6 días post-inoculación. *E. meliloti* 1021 no es capaz de formar curlings ni penetrar en el

pelo (B, C) y *E. meliloti* 1021C2$^+$ se comporta de igual manera (D) aunque existe un aumento en el número de pelos radicales con redirecciones (E). Control sin inocular (A). Las cepas están marcadas con *lacZ*.

El mutante *nfp1* se encuentra alterado "upstream" en la ruta simbiótica de señalización. En este mutante se forman microcolonias y se pueden ver algunos inicios de infección pero nunca canales de infección completos. No obstante, en plantas inoculadas con 1021C2$^+$ se sigue observando una mayor proporción de redirecciones polares (fenotipo RaT) respecto de las plantas control y de las plantas inoculadas con la cepa salvaje (tabla 34), por lo que se puede decir que la acción de la celulasa CelC2 es independiente de los factores de nodulación, confirmándose los resultados obtenidos anteriormente, ya que el fenotipo de este mutante no se ve revertido por la cepa que expresa heterólogamente la celulasa CelC2 de *Rhizobium* .

Tabla 34. Fenotipo simbiótico RaT observado en raíces de *M.truncatula nfp1* a los 6 días post-inoculación con las cepas 1021 y 1021C2$^+$. Los valores muestran la media y el error estándar de al menos 6 plantas por ensayo. Los valores se muestran como la media ± error estándar. Valores seguidos de diferente letra son estadísticamente significativos (Test de Fisher $p \leq 0,05$).

	RaT/cm
Control	0,211 ± 0,044 a
***Em* 1021**	0,502 ± 0,074 a
***Em* 1021C2$^+$**	5,37± 0,24 b

5. Respuestas de defensa de la planta a la expresión heteróloga de CelC2.

Los pelos radicales son estructuras fuertemente polarizadas, resultantes del crecimiento apical de células específicas de la epidermis. El inicio de su formación se caracteriza por los cambios que acontecen en su citoplasma y en el pH de la pared celular en el sitio de desarrollo del pelo (Bibikova *et al*., 1999). Los primeros cambios morfológicos en el pelo son deformaciones en su estructura, que se pueden apreciar entre 2 y 4 horas después de la percepción de los factores de nodulación (Schultze y Kondorosi, 1998). Esta percepción desencadena un flujo de calcio en respuesta, pero no es suficiente *per se* para provocar deformaciones o redirecciones en los pelos radicales (Heidstra *et al*., 1994).

Se ha descrito que el nitrato modula la arquitectura de la raíz (Yendrek *et al.,* 2010) y otros estudios apuntan a la implicación de las citoquininas en la formación de redirecciones y raíces laterales en el sistema radicular (Nishimura *et al.,* 2004). En el caso de los pelos radicales, la reorganización de los microtúbulos observados por Timmers *et al*., (1998, 1999) durante la

aparición de deformaciones y la iniciación y/o desarrollo de la infección rizobiana sugieren una implicación de dichas estructuras en los cambios de dirección del pelo.

Si bien, hasta la fecha, han sido identificados aproximadamente 40 genes que afectan el desarrollo del pelo en uno o más estadios del desarrollo (Grierson y Schiefelbein, 2002), entre ellos hay varios genes de respuesta a patógenos, como ROP GTPasas y NADPH oxidasas (Foreman *et al*., 2003; Jones *et al*., 2006) que producen especies reactivas de oxígeno localizadas en el ápice del pelo.

Al sobreexpresar la celulasa CelC2 se observa una disminución en la formación de típicos curlings, que en su mayoría son aberrantes y se puede apreciar la alteración producida por dicha sobreexpresión (Figura 57 E apartado anterior). También se observa un aumento estadísticamente significativo en el número de redirecciones polares respecto a las producidas por la cepa salvaje, es decir, en el ápice del pelo radicular (Figura 57 D, apartado anterior). Según los datos expuestos anteriormente, una posible explicación de dicho fenotipo puede estar relacionada con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), es decir, respuesta de defensa de la planta frente a la desregulación en la producción de la celulasa CelC2. La existencia de un ligero aumento en la producción de ROS en respuesta a la sobreexpresión de dicha celulasa ha sido demostrada en estudios anteriores (Robledo *et al*., 2011).

Para confirmar estos datos en el sistema simbiótico *Ensifer* - *Medicago*, realizamos ensayos de infección en *M. truncatula* inoculada con las cepas 1021 y 1021C2^{+} en los que a determinados días realizamos un tratamiento con *nitroblue tetrazolium* o NBT, que pone de manifiesto la producción de ROS (superóxido) en el ápice de los pelos radiculares (Santos *et al*., 2001).

Se sumergieron las raíces en una solución de NBT al 0,1% durante aproximadamente 30 minutos y se observaron al microscopio óptico (figura 59).

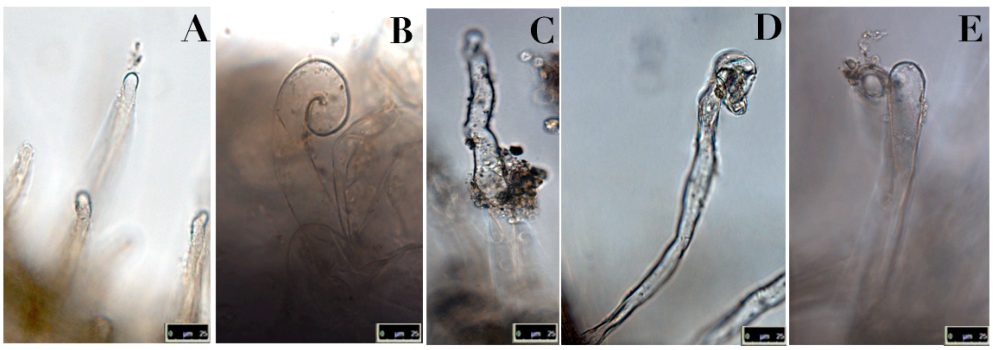


Figura 59. Micrografías de pelos radiculares de *M. truncatula* inoculados con *E. meliloti* 1021 (A, B) y *E. meliloti* 1021C2^{+} (C, D, E) tratados con NBT.

No se observaron diferencias claras en relación a la coloración producida por el NBT (ausencia de coloración) entre los pelos de plantas inoculadas con la cepa 1021C2$^+$ y la cepa salvaje, a ninguno de los tiempos en los que fueron observadas. Robledo y colaboradores llevaron a cabo un método más sensible que el método elegido en nuestro caso, demostrando que, en el sistema simbiótico *Rhizobium - Trifolium* existía un aumento transitorio en la producción de ROS en las plantas inoculadas con la cepa que sobreexpresa la celulasa CelC2, observando mayor intensidad a las 24 horas y a los 25 días post-inoculación (Robledo *et al.*, 2011). Debido a que la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) no se hace patente en estos ensayos, nos planteamos cuantificar la expresión de algunos genes relacionados con la respuesta a ROS *in planta*, para dilucidar qué está ocurriendo en este punto de la infección primaria cuando se sobreexpresa heterólogamente la celulasa CelC2.

En vista de este resultado decidimos llevar a cabo nuevos ensayos de infección en *M. truncatula* con las cepas 1021 y 1021C2$^+$ y analizar a nivel molecular cualquier variación que pudiera ocurrir en la expresión de genes de respuesta defensiva de la planta y/o genes implicados en la elongación del canal de infección ante la expresión heteróloga de la celulasa rizobiana CelC2.

Para ello se analizaron a 6 días post-inoculación distintos genes implicados en respuestas de defensa de la planta que se expresan en el pelo radical, como por ejemplo *pal "phenylalanine lyase"*, *chr7 "chalcone synthase"* y *rip1 "Rhizobium-induced peroxidase 1"* y genes implicados en el correcto desarrollo del canal de infección, como por ejemplo *vpy "vapyrin"* y *rpg "Rhizobium-directed polar growth"* (Jones, 1984; Ballance and Dixon, 1995; Cook *et al.*, 1995; Pumplin *et al.*, 2010; Arrighi *et al.*, 2008). Se realizaron análisis de expresión de estos genes mediante RT-PCR (figura 60), recogiendo el material a los 6 días post-inoculación. Como gen de referencia se utilizó *histone-3-like* (Rey *et al.*, 2013).

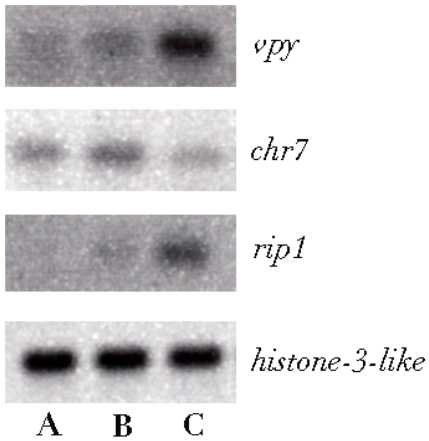


Figura 60. Análisis por PCR semicuantitativa (RT-PCR) de la expresión de los genes *vpy, chr7* y *rip1* en pelos radicales excindidos de plantas sin inocular (A), inoculadas con *E. meliloti* 1021 (B) y *E. meliloti* 1021C2$^+$ (C).

La figura muestra solamente los genes que ofrecieron un resultado fiable a los 30 ciclos de amplificación, que fueron *vpy*, *chr7* y *rip1*. En este análisis podemos observar, de una forma cualitativa, que existe una desregulación en estos genes, estando los genes *vpy* y *rip1* sobrerregulados en los pelos radicales de las plantas inoculadas con la cepa 1021C2^{+}. En cambio, el gen de la chalcona sintasa *chr7* está infrarregulado en estas plantas inoculadas con la cepa 1021C2^{+} con respecto a las plantas inoculadas con la cepa salvaje y las plantas sin inocular.

Estos resultados necesitan ser corroborados cuantitativamente mediante PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR), por ello, utilizando el cDNA de cada tratamiento llevamos a cabo las reacciones pertinentes. En la figura 61 se muestran los resultados obtenidos normalizados con el gen de referencia *histone-3-like*, utilizado muy frecuentemente en *Medicago truncatula*.

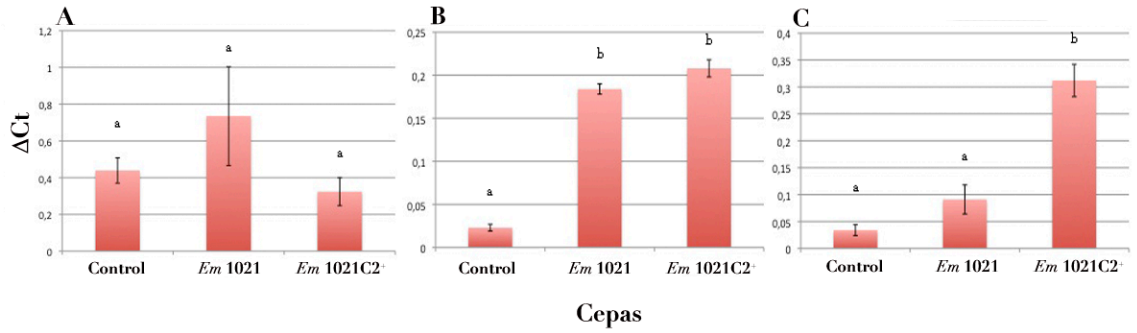


Figura 61. Resultados normalizados de la PCR cuantitativa para el gen *chr7* (A), *vpy* (B) y *rip1* (C). Las barras coronadas por distintas letras corresponden a valores estadísticamente significativos (Test de Fisher p≤0,01).

Los valores normalizados obtenidos para el gen *chr7* (figura 61 A) en los pelos radiculares de plantas inoculadas con la cepa 1021C2^{+} son inferiores a los obtenidos en los pelos de las plantas inoculadas con la cepa 1021 e incluso inferiores a los valores obtenidos para los pelos radicales de las plantas sin inocular, aunque esta disminución no es estadísticamente significativa. Este gen se induce en respuesta a patógenos, como el hongo *Macrophomina phaseolina* (Reyes-Gaige *et al.*, 2010) y se ha descrito que está también inducido, junto con el gen *pal* (incluido en nuestros ensayos preeliminares pero sin claros resultados), en la infección de soja por cepas Fix+ y Fix- de *Bradyrhizobium japonicum* (Estabrook *et al.*, 1991). En nuestro caso, este gen parece estar suprimido, existiendo la posibilidad de que la sobrexpresión de la celulasa CelC2 pueda interferir en la acción de la enzima codificada por dicho gen, alterándose la ruta de biosíntesis de algunos flavonoides.

En cuanto a los valores obtenidos para el gen *vpy* (figura 61 B), también se confirman aunque, debido a la intensidad de la banda en la PCR semicuantitativa, esperaríamos una diferencia mayor en expresión en los pelos de las plantas inoculadas con 1021C2^{+} respecto de los valores obtenidos para la cepa 1021. El gen *vpy* codifica para una proteína denominada Vapyrin, descrita como esencial en la progresión de la infección por micorrizas (Pumplin *et al*., 2010) y, asimismo, esencial en la infección rizobiana (Murray *et al*., 2011). No posee una función totalmente clara en estos momentos pero se ha visto involucrada en el tráfico de vesículas a través de las membranas, y en la remodelación celular, con lo cual, la indución de este gen en nuestros ensayos puede ser debida a la necesidad de los pelos radiculares de recuperarse de la acción de la celulasa CelC2. Los resultados de la PCR cuantitativa reflejan un aumento significativo en la expresión de este gen en los pelos inoculados con respecto al control. Si bien, no es significativo existe un aumento en la expresión en los pelos radiculares de las plantas inoculadas con la cepa 1021C2^{+} respecto de las inoculadas con la cepa 1021.

El caso más llamativo corresponde al aumento en la expresión del gen *rip1* (figura 61 C), que codifica para una peroxidasa que se expresa en el ápice del pelo radicular en la pre-infección por el rizobio compatible, estando su máximo de expresión a las 6 horas post-inoculación, a partir de las cuales se va reduciendo paulatinamente su expresión (Cook *et al*., 1995). Nuestros resultados indican una inducción de este gen a los 6 días post-inoculación en el caso de los pelos de plantas inoculadas con la cepa 1021C2^{+}, cuyos valores son significativamente superiores a los presentados por los demás tratamientos, lo que nos hace pensar que la planta percibe la sobreexpresión de la celulasa CelC2. Este resultado concuerda con las observaciones realizadas por Robledo y colaboradores en el sistema simbiótico *Rhizobium-Trifolium* (Robledo *et al*., 2011), sugiriéndonos que la respuesta de defensa inducida en la planta por la sobreexpresión de la celulasa CelC2 no es suficiente para abortar la infección.

Todos estos resultados deberán ser corroborados y ampliados, incluyendo mayor cantidad de genes, mediante la obtención de microarrays.

Lo que si está claro es que se observa una desregulación en los genes seleccionados, aunque esta desregulación, así como los efectos que produce esta celulasa no son suficientes para abortar completamente el proceso de colonización, infección, nodulación y fijación de Nitrógeno. En capítulos posteriores comprobaremos como este hecho se corresponde con el fenotipo que muestran las plantas inoculadas con las cepas sobrexpresoras de la celulasa de *Rhizobium* en ausencia de Nitrógeno, que son ligeramente superiores en valores de longitud aérea, peso seco y Nitrógeno total respecto a las plantas controles (no inoculadas).

CAPÍTULO 4

Implicación de la celulasa rizobiana CelC2 y su ortóloga en el género *Ensifer* en infección secundaria y desarrollo nodular en el género *Medicago*.

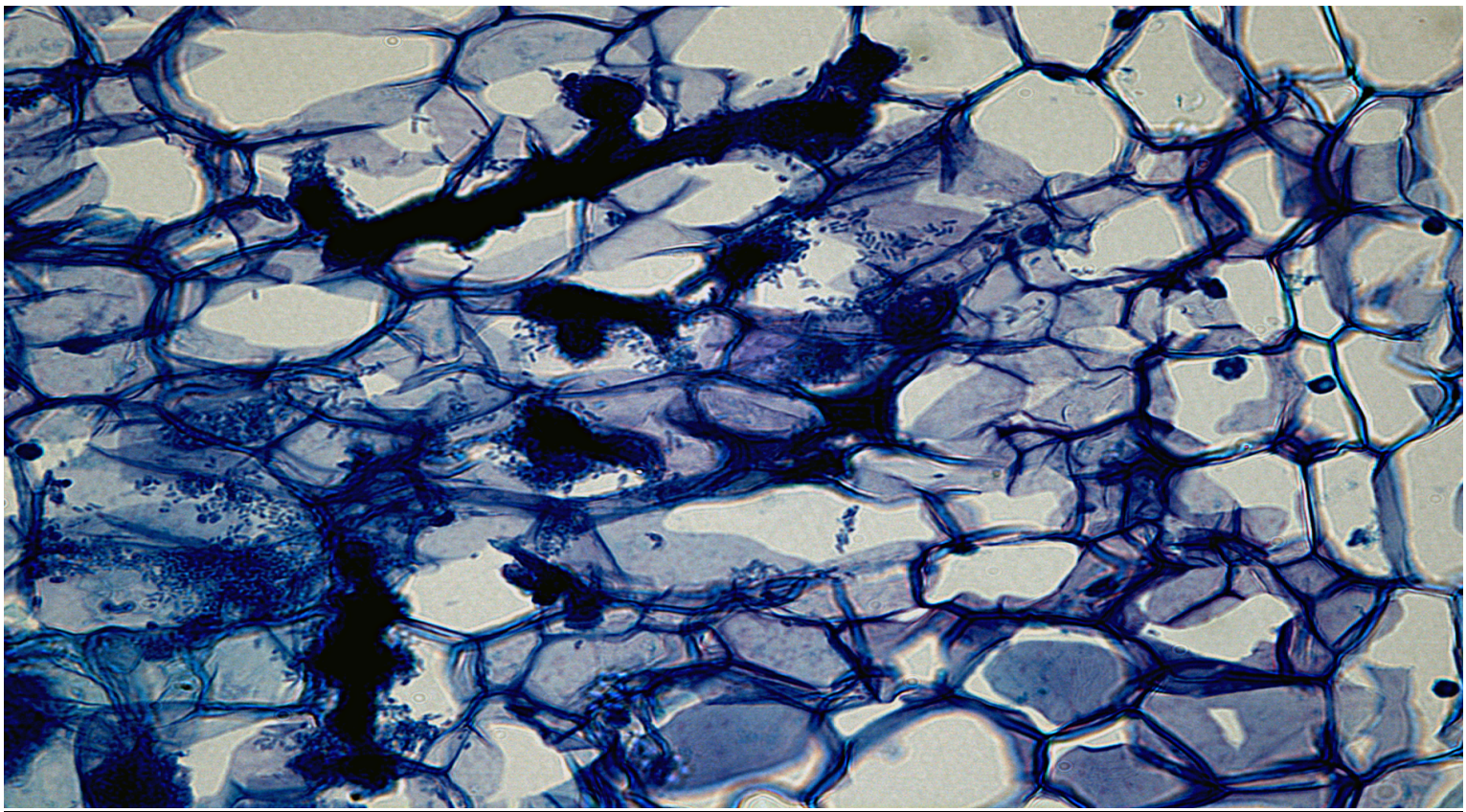


Imagen: Magnificación de un corte histológico que muestra un fenotipo Bar (Bacterial release) afectado en el interior de un nódulo de *M. truncatula* inoculada con *E. meliloti* 1021C2^{+}.

1. Introducción

En este trabajo, utilizamos el sistema simbiótico modelo *Ensifer-Medicago* para establecer una conexión con el sistema *Rhizobium - Trifolium* en cuanto a las funciones de la celulasa rizobiana CelC2. Además, como hemos descrito en el Capítulo 1, *E. medicae* WSM419 posee en su genoma un ortólogo a nuestra celulasa de estudio, localizado en un posible operón conformado por los genes *Smed_5208, Smed_5209* y *Smed_5210*. En este trabajo hemos sobreexpresado el gen *Smed_5210* en la propia cepa, observándose su comportamiento en infección secundaria, como veremos más adelante.

2. Efecto de la expresión heteróloga de la celulasa rizobiana CelC2 en infección secundaria y nodulación en *Medicago*.

2.1 Acción de la celulasa CelC2 rizobiana en la nodulación de los sistemas simbióticos *M. sativa-E. meliloti* 1021 y *M. truncatula-E. meliloti* 1021 en ausencia de Nitrógeno.

Los resultados en infección primaria que se observan al inocular *Medicago truncatula* y *Medicago sativa* con ambas cepas de *E. meliloti* 1021, salvaje y superproductora, son dispares en cuanto a los fenotipos obtenidos y mostrados en los trabajos de Robledo *et al.* en 2011 para la interacción *Rhizobium – Trifolium*, tanto utilizando la cepa salvaje como la superproductora de celulasa de la cepa ANU843 de *R. leguminosarum* bv trifolii (Robledo *et al*., 2011), observándose de la misma manera que en los ensayos presentados en esta tesis doctoral, un alto número de redirecciones polares en los pelos radicales de las plantas inoculadas con la cepa superproductora. Sin embargo, no se detectó fenotipo HoT en *Medicago*, lo que nos indica que existe especificidad.

Para determinar qué es lo que ocurre en los siguientes pasos del proceso de infección y como se llegan a desarrollar los nódulos de ambas plantas del género *Medicago* inoculadas con ambas cepas, salvaje y superproductora, realizamos diferentes ensayos de nodulación. En un primer lugar nos planteamos ensayos en condiciones axénicas (en cultivo hidropónico en tubo) con el fin de conocer la cinética de nodulación que siguen las plantas inoculadas con ambas cepas y la cantidad de nódulos efectivos (Fix+) en cada caso. Además, realizamos ensayos de invernadero (en vermiculita estéril), recolectando en ambos casos nódulos para su posterior estudio mediante microscopía.

2. 1. 1 Cinética de nodulación

En un primer lugar y para conocer como se comporta la celulasa CelC2 en infección secundaria y nodulación cuando se expresa heterólogamente en este sistema simbiótico modelo, se realizaron ensayos de nodulación en tubo

en condiciones axénicas con el fin de determinar el número de nódulos (figura 62 A) que se producían en las plantas inoculadas con ambas cepas, 1021 y 1021C2$^+$, además de su cinética de nodulación (figura 62 B), es decir, un seguimiento de la aparición de los nódulos en el tiempo. Algunos datos preeliminares en *M. truncatula* fueron ya publicados con anterioridad (Robledo TD, 2010).

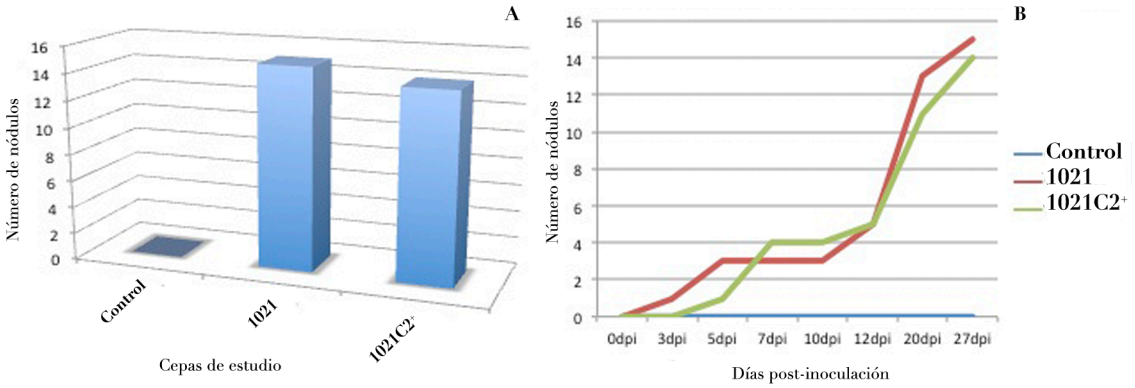


Figura 62. Número total de nódulos (A) y cinética de nodulación (B) de plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con las cepas *E. meliloti* 1021 y 1021C2$^+$ en ausencia de Nitrógeno durante los siguientes 30 días post-inoculación.

El número de nódulos fijadores por planta a lo largo del experimento fué ligeramente superior en plantas inoculadas con la cepa silvestre que en plantas inoculadas con la cepa recombinante 1021C2$^+$. En el caso de las raíces inoculadas con la cepa 1021C2$^+$, los nódulos estaban distribuidos uniformemente por toda la raíz. Aún así, el número de nódulos fijadores al final del experimento fue ligeramente superior en las plantas inoculadas con la cepa silvestre con respecto a las plantas inoculadas con la cepa 1021C2$^+$.

Si observamos la cinética de nodulación, existe un ligero retraso en la aparición de los primeros nódulos en el caso de las plantas inoculadas con la cepa superproductora (Figura 62 B). Este efecto puede ser explicado debido a la disminución y/o supresión de las señales de spiking de calcio y la represión de las nodulinas tempranas que se produce cuando las raíces están sometidas a la presencia de celulasa CelC2 purificada (Robledo TD 2010; Robledo *et al.*, *submitted*).

2. 1. 2 Morfología nodular

Con el objetivo de observar las distintas morfologías que puedan ocurrir en los nódulos de las plantas inoculadas tanto con la cepa salvaje como la cepa superproductora de celulasa CelC2 así como para determinar qué está ocurriendo en el interior del nódulo en ambos casos, se realizaron ensayos de nodulación, tanto en condiciones axénicas, como en condiciones de invernadero, utilizando vermiculita esterilizada como sustrato. Se

seleccionaron nódulos de plantas representativas y se fotografiaron al natural utilizando una cámara fotográfica Nikon DS-Fi1 acoplada a una lupa Nikon SMZ800 (figura 63).

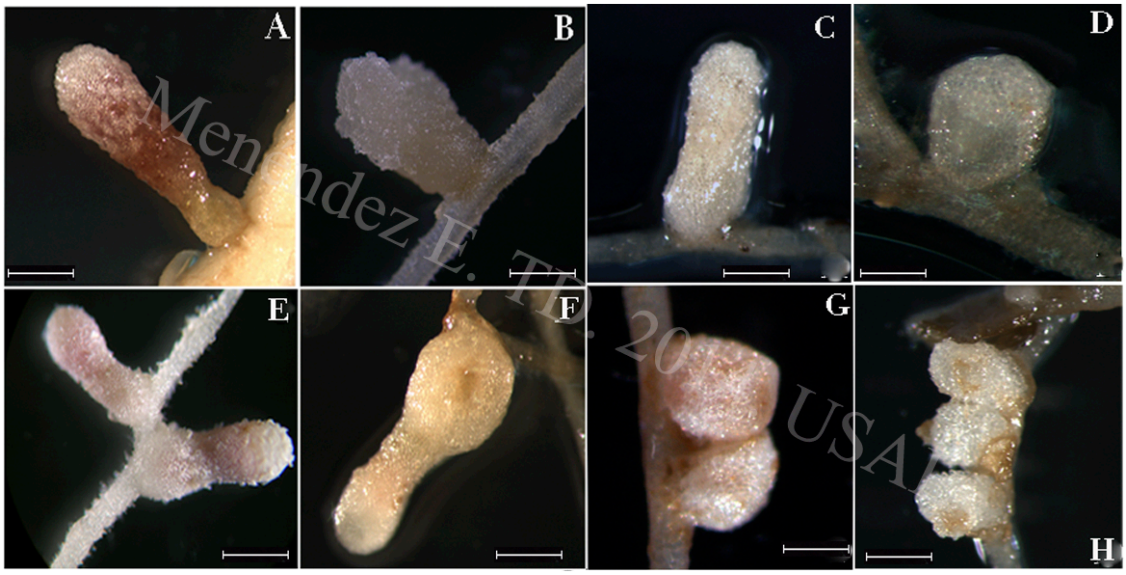


Figura 63. Morfología de nódulos de *M. sativa* inoculadas con *E. meliloti* 1021 (A, E) y *E. meliloti* 1021C2^{+} (B, F), *M. truncatula* inoculadas con *E. meliloti* 1021 (C, G) y *E. meliloti* 1021C2^{+}(D, H). En los nódulos de ambas plantas inoculadas con la cepa silvestre se observa una coloración rosácea y su forma piriforme (A, E, C, G), característica de nódulos indeterminados, mientras que en los nódulos de ambas plantas inoculadas con la cepa superproductora (B, D, F, H) se observan coloraciones blanquecinas y/o marronáceas y formas redondeadas (B, D, H) y/o aberrantes (F). La barra representa la escala 1 mm.

Tanto en ensayos monoxénicos de tubo como en ensayos de invernadero, se comprobó que, tanto en las plantas de *M. sativa* como en *M. truncatula* inoculadas con la cepa superproductora, aparecen un gran número de nódulos inefectivos aberrantes que difieren mucho de los nódulos fijadores generados por la cepa silvestre en ambos casos.

2. 1. 3 Histología nodular

Utilizando los mismos nódulos representativos seleccionados en el apartado anterior, se realizaron cortes histológicos de 2-3 micras y se tiñeron con azul de toluidina al 0,01% para observar las estructuras nodulares internas mediante microscopía óptica utilizando distintos aumentos (figura 64) en un microscopio Nikon Eclipse 80i.

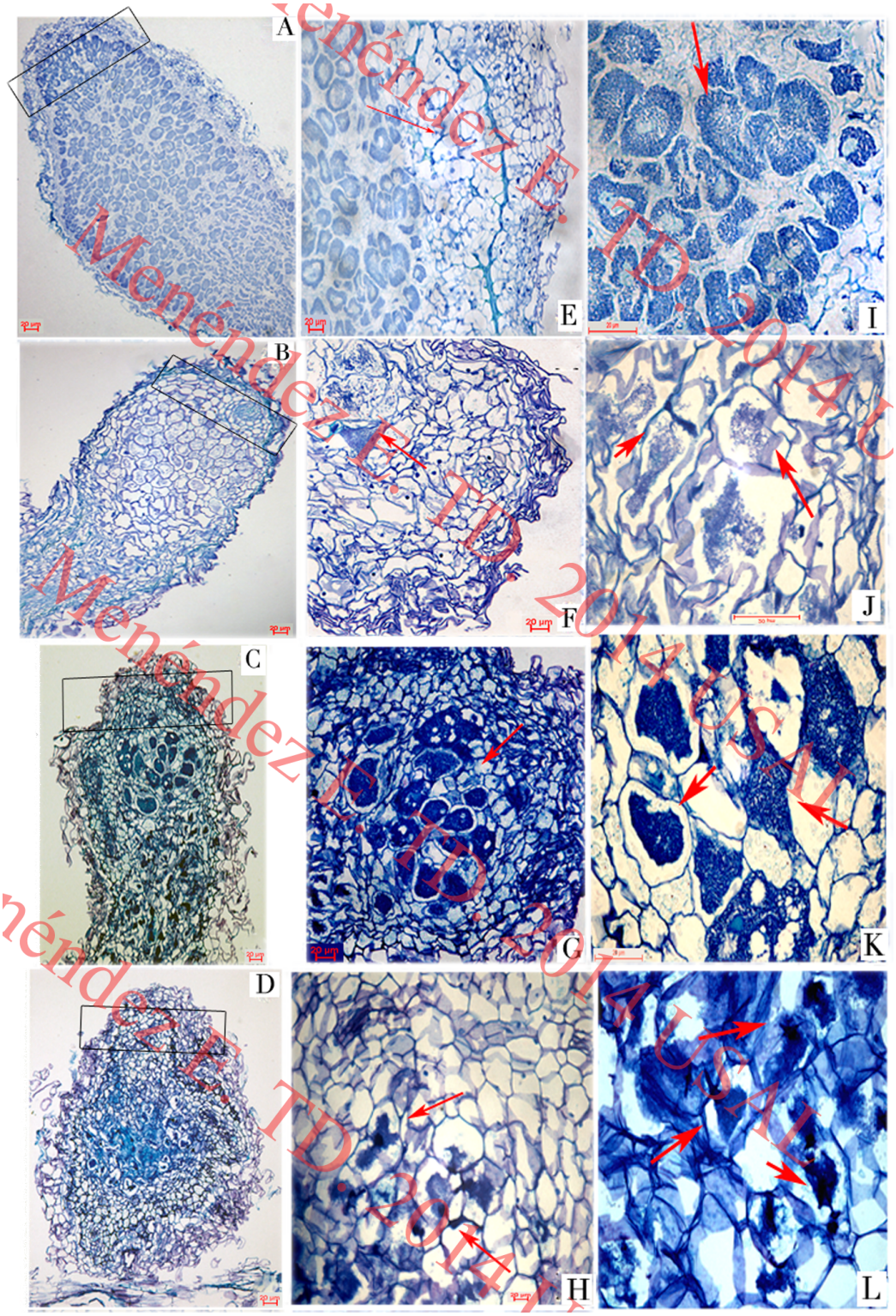


Figura 64. Cortes histológicos realizados en nódulos de *M. sativa* inoculadas con *E. meliloti* 1021 (A, E, I) y *E. meliloti* 1021C2^{+} (B, F, J), *M. truncatula* inoculadas con *E. meliloti* 1021 (C, G, K) y *E. meliloti* 1021C2^{+}(D, H, L). En los nódulos de ambas plantas inoculadas con la cepa superproductora (B, F, J, D, H, L) se muestran zonas desorganizadas correspondientes a la zona de infección del nódulo, con respecto de lo mostrado por los nódulos de la cepa salvaje (A, E, I, C, G, K). El mutante superproductor produce una extensiva degradación del final del canal de infección y no aparecen los típicos simbiosomas (J, L), que sí aparecen perfectamente definidos

en las células de los nódulos de las plantas inoculadas con la cepa salvaje (I, K). Los nódulos de *M. truncatula* inoculadas con la cepa salvaje muestran un menor número de células invadidas (G) respecto a los nódulos de *M. sativa* inoculados con dicha cepa salvaje (E), donde se puede apreciar un mayor número de células infectadas (E, I). Las flechas señalan los eventos referidos en el texto y los recuadros delimitan la zona de infección o zona II, en la cual se observa el efecto de la sobreexpresión de la celulasa CelC2.

Al tomar cortes histológicos de dichos nódulos, se ve que el interior de los nódulos, sobre todo la zona II o zona de infección está desorganizada y no se observan los típicos simbiosomas (figura 64 B, D). Lo que está ocurriendo es que, debido a la desrregulación en la producción de esta enzima, se degrada el final del canal de infección, probablemente debido a que en ese punto las paredes celulares no contienen celulosa cristalina. La bacteria rompe el final del canal de infección desde dentro, no quedando envuelta en la membrana de origen vegetal que constituiría la membrana peribacteroidea, no dando lugar a la diferenciación en bacteroides y no formándose el simbiosoma funcional donde se lleva a cabo la Fijación de Nitrógeno.

Aún así, existen algunas células dentro del nódulo que consiguen ser infectadas (figura 64 M). Estas células fijarán Nitrógeno, aunque como están en minoría respecto de las células invadidas sin formación del simbiosoma, dicha Fijación de Nitrógeno global en la planta se verá disminuida, como comprobaremos en el capítulo siguiente.

Esta deficiencia en la fijación de Nitrógeno viene determinada por un menor número de células nodulares invadidas correctamente. En una simbiosis eficiente, como en las simbiosis *Trifolium – Rhizobium* (Robledo *et al.*, 2011) y *Medicago sativa – E. meliloti* 1021, la mayoría de las células nodulares en la zona de fijación están invadidas (figura 64 A, E). Nuestros resultados muestran cómo esto no sucede en la simbiosis *M. truncatula – E. meliloti* 1021 (figura 64 C, G), la cual no es una simbiosis muy eficiente (Terpolilli *et al.*, 2008) aunque aún así, en este sistema simbiótico, se pueden apreciar las diferencias respecto a la desorganización interna entre las plantas inoculadas con la cepa salvaje y las plantas inoculadas con la cepa superproductora.

2. 2 Acción de la CelC2 rizobiana en la nodulación del sistema simbiótico *M. truncatula-E. meliloti* 1021 en presencia de Nitrógeno.

Para confirmar que el efecto de desorganización interna observado en nódulos de plantas inoculadas con la cepa *E. meliloti* 1021C2^{+} es debido a la expresión, en este caso heteróloga, de la celulasa CelC2, decidimos realizar ensayos de invernadero en presencia de una concentración constante de Nitrógeno añadida al fertilizante (5mM NH_4NO_3) durante tres meses. Pasado este tiempo, recolectamos nódulos de las raíces de las plantas inoculadas con ambas cepas.

2. 2. 1 Morfología nodular

Los nódulos recolectados presentaban una morfología similar en ambos casos, como se muestra en la figura 65.

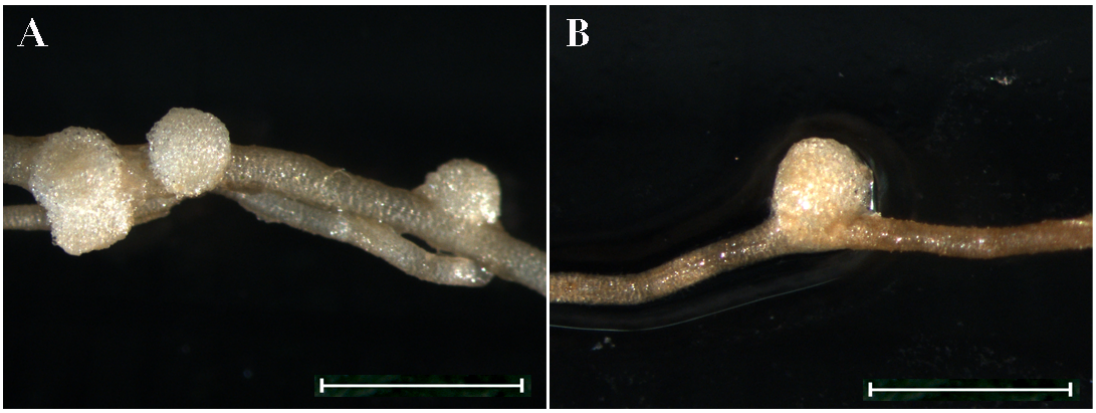


Figura 65. Morfología de nódulos de *M. truncatula* inoculadas con *E. meliloti* 1021 (A) y *E. meliloti* 1021C2^{+}(B). En los nódulos de ambas plantas inoculadas con la cepa silvestre se observa una coloración blanquecina y una forma redondeada, signo de que no son funcionales. La barra representa la escala 1 mm.

Dichos nódulos presentaban una morfología esférica y una coloración blanquecina, características típicas de un nódulo no fijador. Estos nódulos aparecen debido a que, aunque se aborte la infección intracelular debido a la presencia de Nitrógeno, las plantas perciben igualmente a la bacteria, o en su caso, sus factores de nodulación, por lo que se induce la formación de nódulos pero estos no llegan a madurar.

2. 2. 2 Histología nodular

Además de la morfología nodular observada, decidimos realizar cortes histológicos de los nódulos recolectados con el fin de observar mejor sus estructuras internas y poder comprobar si están infectados (figura 66).

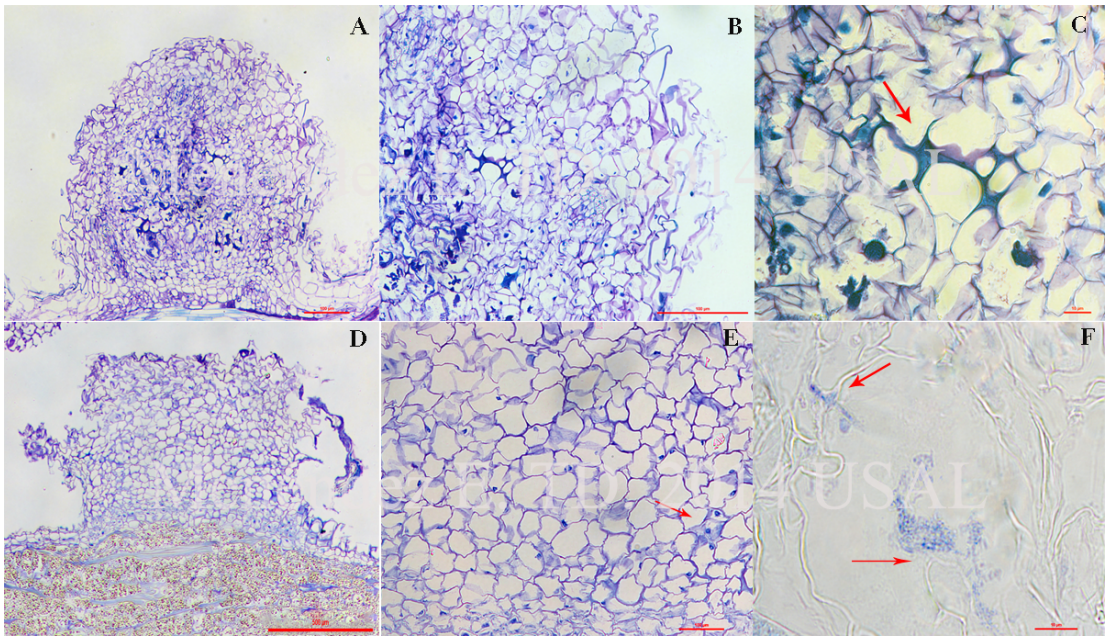


Figura 66. Cortes histológicos realizados en nódulos de *M. truncatula* inoculadas con *E. meliloti* 1021 (A, B, C) y *E. meliloti* 1021C2^{+} (D, E, F). Los nódulos de ambas inoculaciones no poseen simbiosomas formados (A, D) aunque se observa infección intercelular en ambos casos (B, E). Las bacterias entran por espacios intercelulares en ambos casos (C, F), aunque existe cierta degradación de paredes celulares en los nódulos de la cepa 1021C2^{+} (F). Las flechas señalan los eventos referidos en el texto.

Los nódulos de ambas inoculaciones presentaban zonas con células vacías, es decir, con un nivel de ocupación similar entre ellas (figura 66 A, D). No se observan, en ninguno de los dos casos, células ocupadas por simbiosomas funcionales. Sin embargo, se observan bacterias en espacios intercelulares, por lo que estas bacterias han podido entrar en los nódulos de esta manera (figura 66 B, E). Además, si observamos las preparaciones con un objetivo mayor (figura 66 C, F) podemos observar la infección intercelular más de cerca y, en los nódulos de la cepa 1021C2^{+}, se observa ruptura de las paredes celulares, aunque en menor medida que en los nódulos de la misma cepa en ausencia de Nitrógeno (figura 66 F).

2. 3. Acción de la CelC2 rizobiana en la nodulación del sistema simbiótico *M. truncatula-E. medicae* WSM419

La cepa *E. medicae* WSM419, al igual que otras cepas de *E. meliloti* y de *E. medicae*, posee una celulasa de la misma familia (GH8) que la celulasa CelC2 y además conforma un posible operón *celABC* ya que está precedida por dos genes de función similar a *celA* y *celB*. Por este motivo y porque es el endosimbionte natural más eficiente de *Medicago truncatula*, nuestra planta principal de estudio, elegimos sobreexpresar heterólogamente la celulasa rizobiana CelC2 en *E. medicae* WSM419, originando la cepa WSM419C2^{+}, y observar si muestra un efecto similar en infección secundaria y en desarrollo

nodular que el observado en el apartado anterior expresando dicha celulasa en una cepa que no contiene homólogos, como es *E. meliloti* 1021.

2. 3. 1 Cinética de nodulación

Para observar como se comporta el nuevo mutante sobreexpresor de CelC2 de *Rhizobium* en infección secundaria y desarrollo nodular, realizamos ensayos de nodulación al igual que se realizaron en el apartado anterior, tanto en tubo como en invernadero. Con los ensayos axénicos en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad en cámara de cultivo realizamos un contaje del número de nódulos cada dos días, con el fin de conocer su cinética de nodulación (figura 67 A). Además, a los 30 días post-inoculación, se contaron los nódulos totales (figura 67 B) y se fotografiaron en una lupa estereoscópica, para posteriormente realizar cortes histológicos.

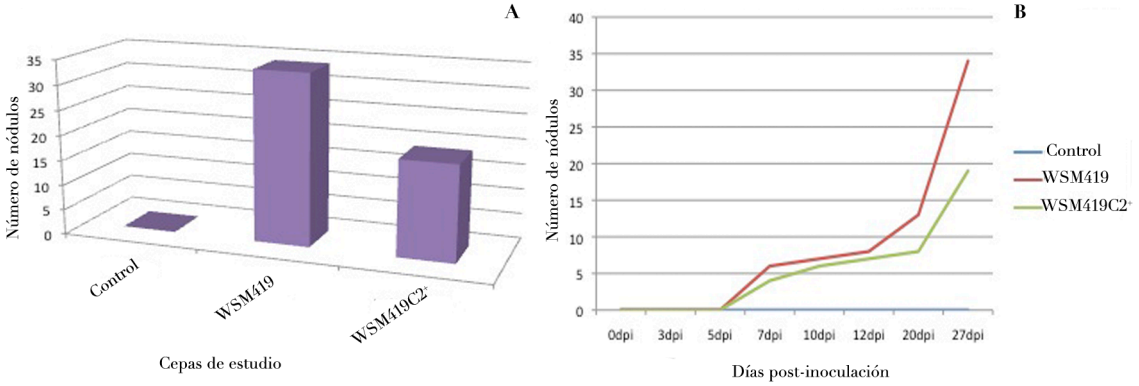
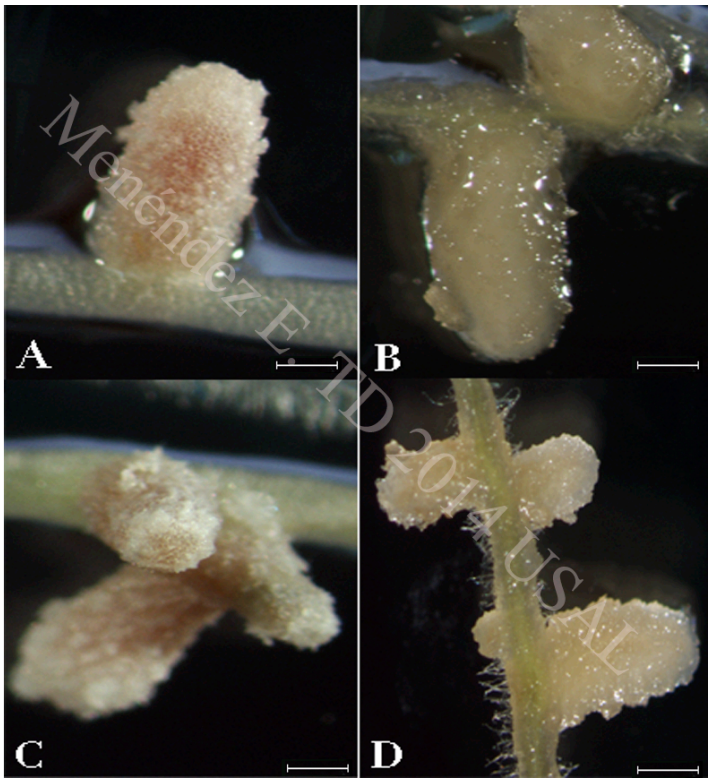


Figura 67. Número total de nódulos (A) y cinética de nodulación (B) de plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con las cepas *E. medicae* WSM419 y WSM419C2^{+} en ausencia de Nitrógeno durante los siguientes 30 días post-inoculación.

En la cinética de nodulación (figura 67 A) realizada para estas dos cepas podemos observar cómo la inoculación de la cepa WSM419 claramente produce un mayor número de nódulos en la planta a lo largo del tiempo respecto de las plantas inoculadas con la cepa superproductora. En este caso particular, el número de nódulos totales, tanto Fix+ como Fix-, de la cepa superproductora es menor en relación al número de nódulos de la cepa salvaje, como se puede observar en la gráfica correspondiente (figura 67 B).

2. 3. 2 Morfología nodular

Con el fin de observar con más precisión la morfología nodular, se recogieron nódulos de cada uno de los tratamientos y se fotografiaron de la misma manera que se realizó en el apartado anterior (figura 68).



Menéndez E. TD 2014 USAL

Figura 68. Morfología de nódulos de plantas de *M. truncatula* inoculadas con *E. medicae* WSM419 (A, C) y *E. medicae* WSM419C2^{+} (B, D). La morfología de los nódulos de las plantas inoculadas con la cepa superproductora (B, D) es irregular y muestran un color blanquecino con respecto a los nódulos de plantas inoculadas con la cepa salvaje (A, C) que son morfológicamente normales y fijadores.

Las diferentes morfologías observadas en el caso de los nódulos provenientes de raíces de plantas inoculadas con la cepa salvaje (figura 68 A, C) respecto al caso de nódulos provenientes de raíces de plantas inoculadas con la cepa 1021C2^{+}, apunta a que la sobreexpresión, también heteróloga, de la celulasa CelC2 rizobiana en *E. medicae* WSM419 tiene un efecto similar al observado anteriormente en los casos de sobreexpresión en *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843 en trébol y en la expresión heteróloga en *E. meliloti* 1021 en *M. truncatula*.

2. 3. 3 Histología nodular

Además, se realizaron cortes histológicos para observar las estructuras internas y dilucidar si la desorganización del tejido celular de la zona de infección del nódulo producida por la sobreexpresión de la celulasa rizobiana CelC2 se mantiene cuando esta enzima es sobreexpresada en el endosimbionte homólogo más eficiente descrito, es decir, *E. medicae* WSM419 (figura 69).

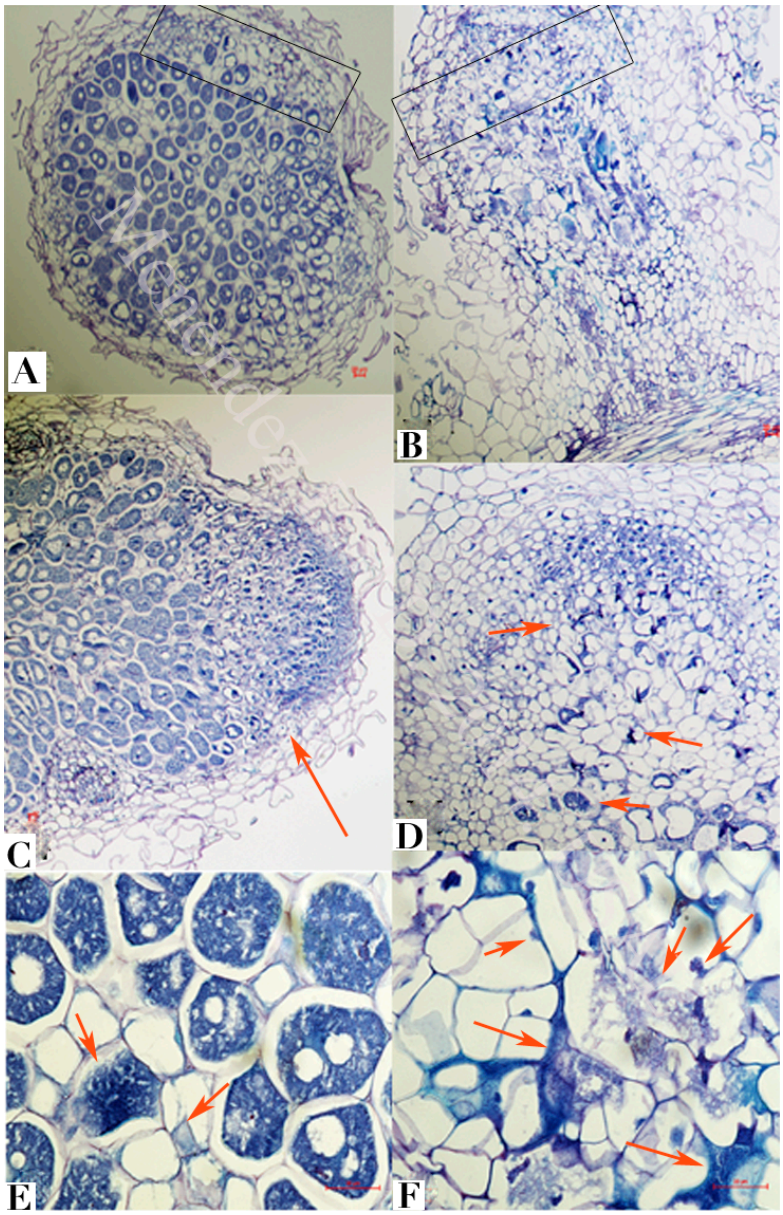


Figura 69. Cortes histológicos realizados en nódulos de *M. truncatula* inoculadas con *E. medicae* WSM419 (A, C, E) y *E. medicae* WSM419C2^{+} (B, D, F). En los cortes histológicos de las plantas inoculadas con la cepa superproductora (B, D, F) se observan zonas desorganizadas correspondientes a la zona de infección del nódulo (B), con respecto de lo mostrado por los nódulos de la cepa salvaje (A, C, E), que contienen sus zonas intactas (A). Se observa una degradación de paredes celulares y la liberación de bacterias no diferenciadas al interior celular (F) en el caso de los nódulos de la cepa WSM419C2^{+}, respecto de las células ocupadas por bacterias diferenciadas de los nódulos de la cepa salvaje (E). Las flechas señalan los eventos referidos en el texto. Los recuadros muestran la zona de infección o zona II.

En los cortes de nódulos infectados con la cepa WSM419C2^{+}, se observa una cierta desorganización en la zona de fijación (figura 69 B), similar a los casos descritos anteriormente, aunque si bien, desde un objetivo con menores aumentos (10X y 20X), esta desorganización parece menor,

existiendo un gran número de células vacías (figura 69 D). Si cambiamos a un objetivo con más aumentos (63X), podemos observar con más detalle que sí existe degradación de las paredes celulares vegetales, encontrándose las bacterias en el interior de las células sin verse rodeadas por la membrana peribacteroidea, por lo tanto, sin la formación de simbiosomas funcionales (figura 66 F). Además, observamos que la degradación se localiza en el final del canal de infección, liberándose las bacterias al interior celular, aunque muchas de ellas, también se encuentran retenidas en espacios intercelulares (figura 66 F). Los canales de infección observados en los nódulos de la cepa superproductora mantienen su estructura aunque, frecuentemente, se forman engrosamientos en algunas partes de dichos canales (figura 69 F).

Los nódulos observados pertenecientes a la cepa silvestre WSM419, presentan una morfología típica (figura 69 A, C), con una coloración rosácea característica de un nódulo fijador de Nitrógeno totalmente funcional. Atendiendo a la histología nodular, se observa un nódulo ocupado (figura 69 A) con las zonas meristemática (I), de infección (II) y de fijación (III) muy bien delimitadas (el recuadro de la figura 69 A muestra la zona II o de infección). Si ampliamos la zona de fijación, podemos observar las células invadidas con bacterias diferenciadas (figura 69 C, E), al igual que células que no se encuentran invadidas, si bien, éstas no son tan abundantes como en el interior de los nódulos de *M. truncatula* inoculada con *E. meliloti* 1021, poniéndose de manifiesto la mayor eficiencia de la cepa *E. medicae* WSM419 respecto de *E. meliloti* 1021 en *M. truncatula*.

3. Efecto de la sobreexpresión de un ortólogo de la celulasa CelC2 en *Ensifer* en infección secundaria y nodulación de *Medicago truncatula*.

Al determinar en el capítulo anterior la especificidad de la celulasa CelC2 por celulosa no cristalina en el ápice del pelo radicular de su planta homóloga, es decir, la especificidad en infección primaria, y al observar en los apartados anteriores de este capítulo y en otras publicaciones relacionadas que esta especificidad no se mantiene en infección secundaria, es decir, que los eventos observados cuando se sobreexpresa esta celulasa en una u otra de las cepas utilizadas, los resultados siempre muestran el mismo fenotipo, decidimos comprobar si el ortólogo a la celulasa CelC2 encontrado en la cepa WSM419 de *E. medicae* producía el mismo efecto al ser sobreexpresado en la propia cepa e inoculado en plantas de *Medicago truncatula*.

Para ello, realizamos un ensayo preeliminar de nodulación con la cepa *E. medicae* WSM419 que sobreexpresa su propia celulasa de la misma forma que realizamos los ensayos con las cepas anteriores, además del respectivo control negativo de plantas sin inocular y la inoculación de plantas con la cepa sin transformar. Además, al igual que en los ensayos anteriores, se incluyó un

control transformado con el vector vacío, el cual tuvo un comportamiento similar a la cepa silvestre.

3. 1 Cinética de nodulación

De la misma manera que en apartados anteriores, realizamos una cinética de nodulación y un contaje final de nódulos (figura 70) de plantas inoculadas con la cepa superproductora, además de la cepa silvestre y un control sin inocular.

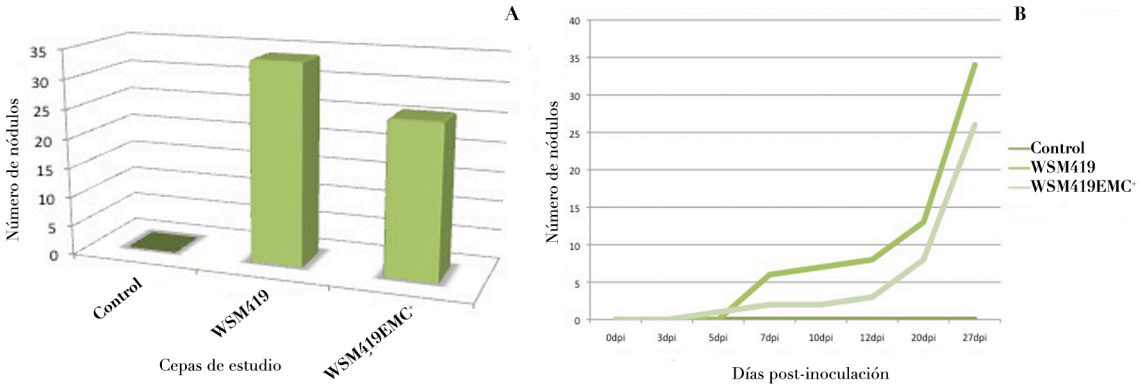


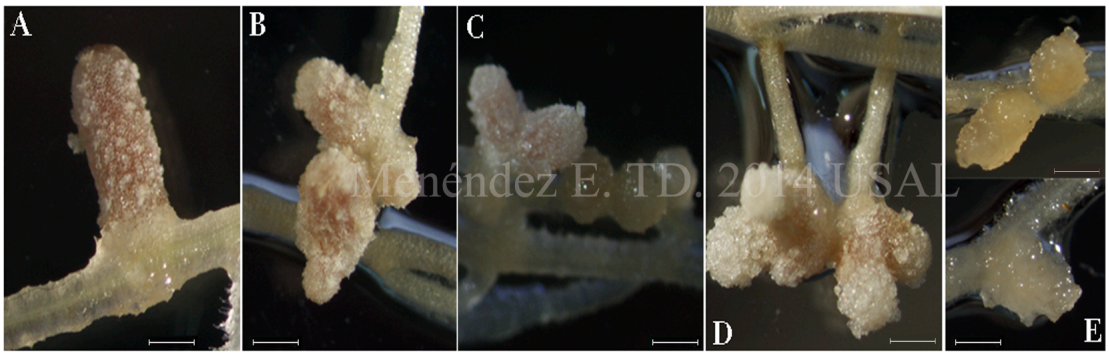
Figura 70. Número total de nódulos (A) y cinética de nodulación (B) de plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con las cepas *E. medicae* WSM419 y WSM419EMC$^+$ en ausencia de Nitrógeno durante los siguientes 30 días post-inoculación.

En las plantas inoculadas con la cepa superproductora de la propia celulasa de *Ensifer*, podemos observar que existe una menor cantidad de nódulos totales (figura 70 B), además de un retraso en la cinética de nodulación (figura 70 A) respecto de lo ocurrido en el caso de la inoculación con la cepa salvaje. Este retraso en la nodulación ocurrida en este caso, es similar al ocurrido en los casos expuestos en los anteriores apartados.

3. 2 Morfología e histología nodular

Los nódulos encontrados en las raíces de las plantas inoculadas con la cepa *E. meliloti* 1021 y su derivada expresora de la celulasa CelC2 rizobiana mostraban morfologías similares a los encontrados en otras combinaciones de leguminosas con las cepas de estudio, tanto salvajes como sobre/expresoras de celulasa rizobiana.

En el caso de los nódulos encontrados en las raíces de plantas inoculadas con la cepa WSM419EMC$^+$, encontramos morfologías diferentes (figura 71), incluso diferentes de las que nos encontramos en los casos anteriores.



Menéndez E. TD. 2014 USAL

Figura 71. Morfología de los distintos tipos de nódulos que aparecen en las raíces de las plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con la cepa superproductora del ortólogo de la CelC2 en *Ensifer medicae* WSM419 (WSM419EMC^{+}). De entre estas diversas morfologías se pueden observar nódulos piriformes fijadores (A), nódulos con zonas estrechas (B), nódulos redondos no fijadores (C), nódulos dobles con zonas blancas (D) y nódulos marrones con apariencia gomosa y redondeada (E).

Existen varios tipos de nódulos que, por morfología, se pueden clasificar en fijadores normales y en aberrantes. Dentro de estos últimos hay un tipo de nódulo piriforme, en ocasiones doble, que al observarlo en la lupa estereoscópica no presenta la típica coloración rosácea de los nódulos fijadores (figura 71 D). Aún así esto puede deberse a que este nódulo, aunque esté invadido, no sea eficiente en fijación de Nitrógeno, como ocurre en el caso de la interacción *M. truncatula- E. meliloti* 1021 (figura 64 C), respecto de la interacción de la misma cepa con *M. sativa* (figura 64 A).

Se realizaron diversos cortes histológicos, al igual que en los caso anteriores, atendiendo a la diversidad de morfología de nódulos encontrada (figura 72).

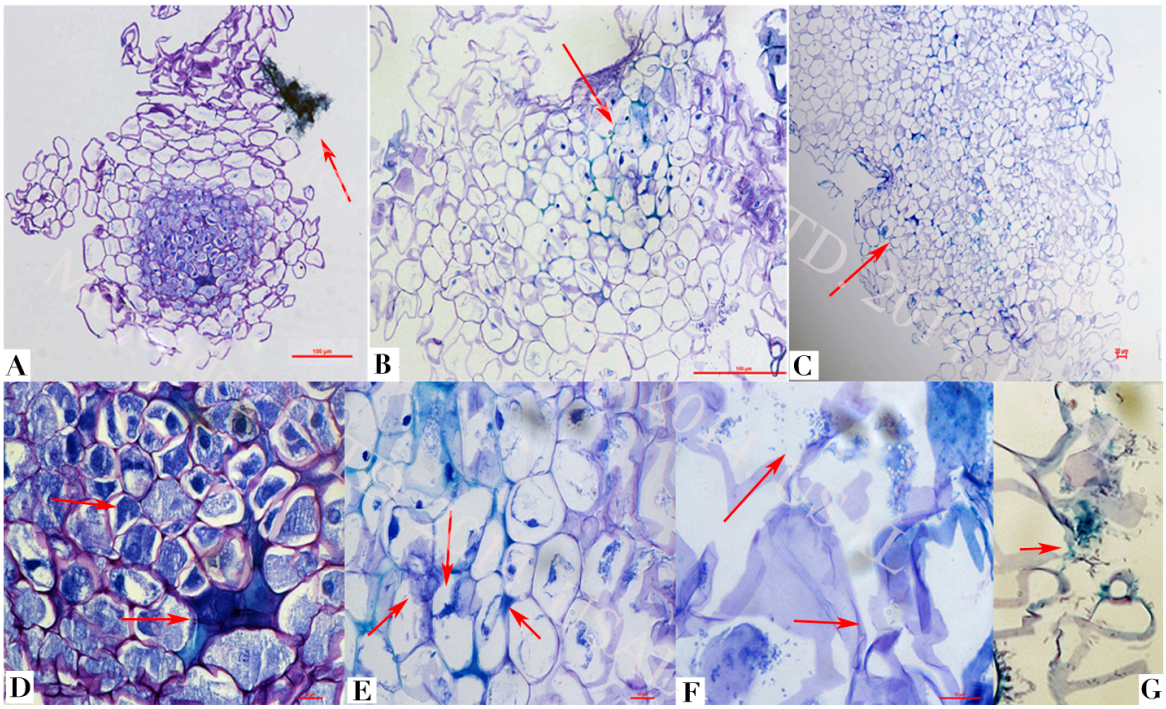


Figura 72. Cortes histológicos de los distintos tipos de nódulos que aparecen en las raíces de las plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con la cepa superproductora del ortólogo de la CelC2 en *Ensifer medicae* WSM419 (WSM419EMC^{+}). Se observan nódulos fijadores (A, corte transversal) con estructuras internas similares a las observadas en la cepa salvaje (D), además de contener células en espacios intercelulares. Se observan nódulos aberrantes con el interior en su mayoría vacío (B, C). Se aprecian bacterias ocupando espacios intercelulares, formando canales (E), y bacterias sueltas dentro de las células vegetales (F), algunas de ellas rompiendo la pared celular de las células vegetales (F, G). Las flechas señalan los eventos referidos en el texto.

Gracias a los cortes histológicos realizados, se puede observar como el interior de estos nódulos, que en un principio serían fijadores, están invadidos (figura 72 A, D) existiendo también células en espacios intercelulares (figura 72 D). Además, señaladas en la figura 72 A, podemos observar cómo existen bacterias en el exterior del nódulo, las cuales han tenido que soportar muchos tratamientos químicos en el proceso de inclusión en parafina, seccionado y tinción con azul de toluidina. Estas bacterias se encuentran formando un biofilm en la base del nódulo. A partir del acúmulo de bacterias se puede observar como algunas serán capaces de entrar por, predeciblemente, espacios intercelulares. Estos nódulos, aunque en un principio podrían ser fijadores, tienen distinta morfología como se observa en los cortes hisológicos, que son diferentes de los que presenta la cepa silvestre (figura 69 A, C, E)

A parte de estos nódulos invadidos, podemos observar otros tipos de nódulos aberrantes que en apariencia se asemejan a tumores y que muestran

A parte de estos nódulos invadidos, podemos observar otros tipos de nódulos aberrantes que en apariencia se asemejan a tumores y que muestran una coloración marronácea a la vez que también, existen nódulos blancos redondeados, posiblemente no infectados al igual que los primeros (figura 71 C, E). Si atendemos a los cortes histológicos realizados en estos nódulos, que en un primer momento parecen vacíos en su interior (figura 72 B, C), existen bacterias alojadas en los espacios intercelulares y canales de infección (figura 72 E). Además, aunque no se observa una desorganización del interior celular tan característica como es la producida por la sobreexpresión de la celulasa CelC2 rizobiana, podemos ver como existe ruptura de paredes celulares en el interior del nódulo y una degradación del final de los canales de infección (figura 72 F, G).

Este nuevo fenotipo en nodulación producido por la inoculación de la cepa WSM419EMC^{+} resulta muy interesante debido a que la degradación de paredes celulares ocurre, pero de una forma que no desorganiza completamente la estructura nodular. Para profundizaren la estructura de estos nódulossería necesario realizar microscopía electrónica (TEM).

CAPÍTULO 5

Implicaciones de la sobreexpresión de la celulasa CelC2 de *Rhizobium* y su ortóloga en *Ensifer* en el desarrollo vegetal de *Medicago truncatula*

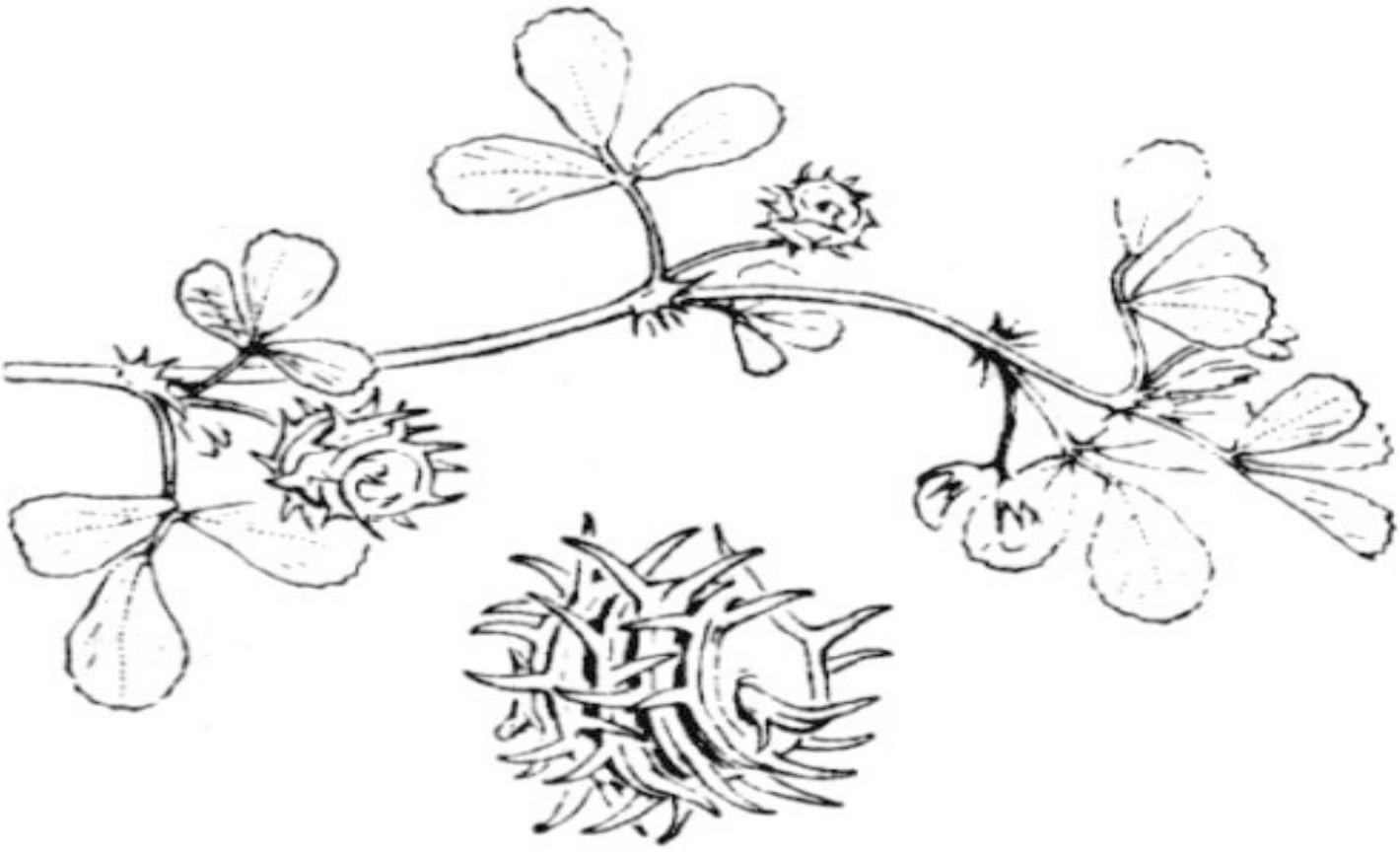


Imagen: Dibujo de una planta de *Medicago truncatula*, con detalle de una de sus vainas.

1. Introducción

Una vez conocidos los efectos en infección primaria e infección secundaria de las distintas cepas de estudio pertenecientes al género *Ensifer* (referidos en los capítulos anteriores), tanto de las cepas salvajes como de las cepas sobreexpresoras de la celulasa CelC2 de *Rhizobium* y de la celulasa ortóloga CelC en *Ensifer medicae*, procedimos al estudio del fenotipo de las plantas de *Medicago truncatula* cuando se produce la interacción de estas cepas con dicha planta.

Estos ensayos se realizaron bajo condiciones controladas de invernadero, tanto en ausencia como en presencia de Nitrógeno, para evitar las limitaciones en el desarrollo vegetal que nos proporcionarían los ensayos monoaxénicos en cámara iluminada. En estos ensayos se utilizó vermiculita lavada y sometida a 3 ciclos de esterilización como sustrato inerte. Además se utilizó como solución fertilizante, la misma solución utilizada en los ensayos de infección y nodulación, es decir, solución de Fâhraeus (Fähraeus, 1957). Esta solución se suplementó con NH_4NO_3 a una concentración final de 5mM, suficiente para inhibir la infección intracelular.

2. Desarrollo vegetal en ausencia de Nitrógeno

2. 1. Fenotipo presentado por plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con *E. meliloti* 1021 y su derivado *E. meliloti* 1021C2$^+$ en ausencia de Nitrógeno.

La simbiosis entre *E. meliloti* 1021 y *M. truncatula* no resulta muy efectiva en la fijación de Nitrógeno ya que pese a que se desarrollan un gran número de nódulos, éstos no suelen ser claramente efectivos y las plantas no se desarrollan como lo hacen las plantas inoculadas con *E. medicae* WSM419, la cepa más efectiva en esta leguminosa modelo, según datos publicados por Terpolilli y colaboradores en los que, inoculando distintas especies de *Medicago*, entre ellas, distintas variedades de *M. truncatula*, llegaron a la conclusión de que esta cepa incrementa el peso seco de la raíz más de un 70% respecto de la inoculación con *E. meliloti* 1021. Además, según el contenido en Nitrógeno de las distintas especies a estudio, observaron que había un incremento significativo en las plantas de *M. truncatula* inoculadas con *E. medicae* WSM419 con respepcto a *E. meliloti* 1021, cuyo valor de fijación de Nitrógeno fué subóptimo (Terpolilli *et al*., 2008).

En los ensayos de invernadero realizados en plantas de *M. truncatula* inoculadas con *E. meliloti* 1021 y con su derivado superproductor 1021C2$^+$, podemos observar un desarrollo de la planta similar al mostrado en ensayos similares de *Trifolium repens* inoculados con la cepa ANU843 y su derivado superproductor (Robledo *et al.,* 2011), resultando en un desarrollo significativamente menor en las plantas inoculadas con la cepa superproductora (figura 73).



Figura 73. Fenotipo mostrado por las plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con el mutante sobreproductor *E. meliloti* 1021C2^{+} (A), inoculadas con *E. meliloti* 1021 (B) y plantas control sin inocular (C). Estas plantas se cultivaron durante 90 días en condiciones de invernadero en ausencia de fertilizantes nitrogenados.

Tanto la disminución de la longitud aérea de la planta (figura 74 A) como del peso seco de la parte aérea (figura 74 B) pusieron de manifiesto dicha disminución en el desarrollo vegetal de las plantas inoculadas con la cepa superproductora respecto a las plantas inoculadas con la cepa salvaje. Los datos obtenidos con la cepa superproductora son ligeramente superiores al control sin inocular, siendo también estadísticamente significativa dicha diferencia tanto en longitud aérea como en peso seco.

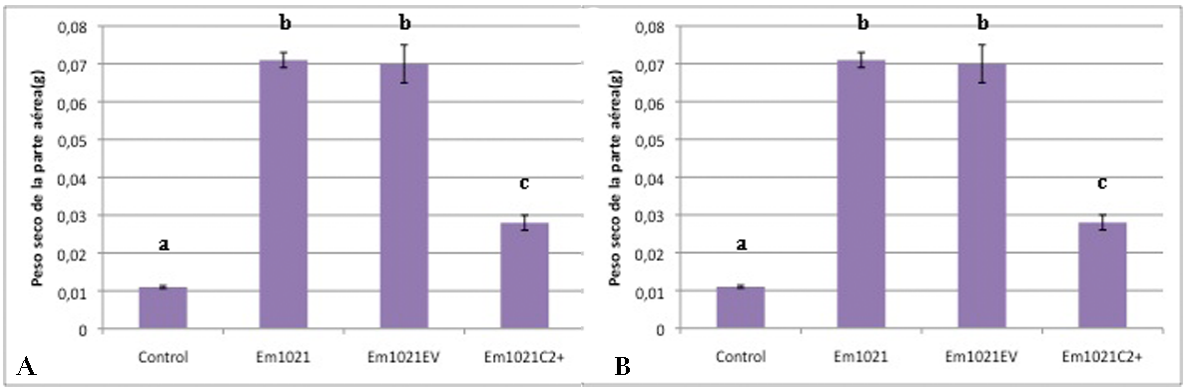


Figura 74. Longitud de la parte aérea (A) y peso seco de la parte aérea (B) de plantas de *Medicago truncatula* cultivadas bajo condiciones controladas de invernadero durante tres meses y abonadas con solución de Fâhraeus sin Nitrógeno. La gráfica se realizó con valores medios representativos de tres experimentos independientes de al menos 30 plantas cada uno. Las barras de error representan el error estándar. Los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos (Test de Fischer $p \geq 0{,}01$).

En cuanto a la longitud de las raíces (figura 75), no existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos pero sí se observa una disminución progresiva en el desarrollo radicular de las plantas inoculadas respecto a las plantas control. Estas plantas sin inocular tenían las raíces más largas pero con menor volumen que las raíces de las plantas inoculadas, posiblemente por la "búsqueda de nutrientes" realizada por parte de la planta.

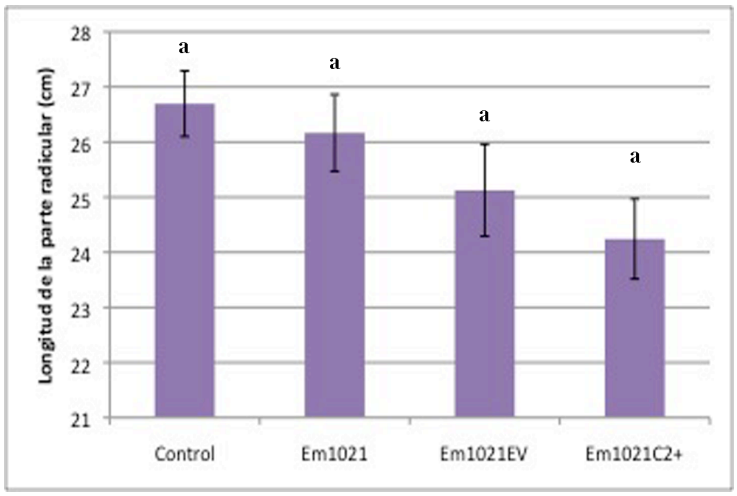


Figura 75. Longitud de la parte radicular de plantas de *Medicago truncatula* cultivadas bajo condiciones controladas de invernadero durante tres meses y abonadas con solución de Fâhraeus sin Nitrógeno. La gráfica se realizó con valores medios representativos de tres experimentos independientes de al menos 30 plantas cada uno. Las barras de error representan el error estándar. Los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos (Test de Fischer $p \geq 0{,}01$).

En estos ensayos se introdujeron bandejas con el mismo número de plantas inoculadas con la cepa 1021EV ("*empty vector*"), que contiene el plásmido pBBR1MCS-2 vacío, como control. Los valores que resultan de esta inoculación son similares a los de la cepa salvaje, confirmando así que la presencia del gen *celC* es al que realmente se debe este fenotipo y no al vector en sí.

Además de estos parámetros decidimos analizar la cantidad de Nitrógeno fijado (figura 76). Como se puede observar en la gráfica, las plantas inoculadas con la cepa salvaje presentan unos valores de fijación de Nitrógeno significativamente superiores a los de las plantas control sin inocular y a los de las plantas inoculadas con la cepa superproductora.

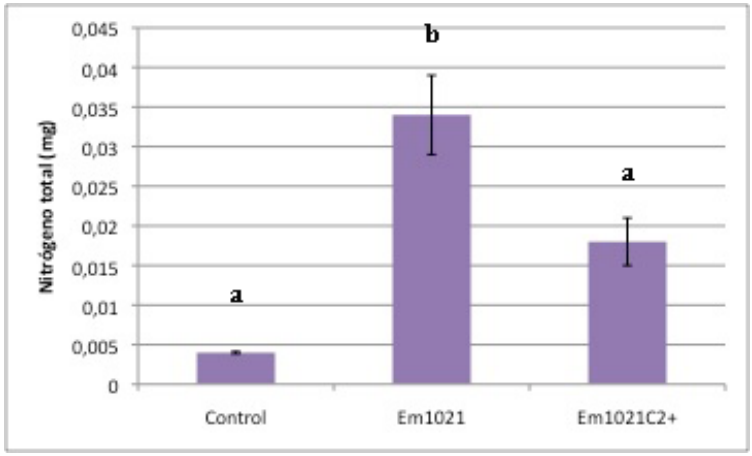


Figura 76. Contenido en Nitrógeno de plantas de *Medicago truncatula* cultivadas en invernadero durante tres meses y abonadas con solución de Fâhraeus sin Nitrógeno. La gráfica se realizó con valores medios representativos de tres experimentos independientes de al menos 30 plantas cada uno. Las barras de error representan el error estándar. Los valores seguidos de la misma letra no son significativos (Test de Fischer $p \geq 0{,}01$).

Si bien no existen diferencias estadísticamente significativas, hemos observado valores de contenido en Nitrógeno mayores en las plantas inoculadas con la cepa 1021C2^{+} respecto a las plantas control sin inocular. Esto pone de manifiesto que en estas plantas inoculadas con la cepa superproductora existe una pobre fijación de Nitrógeno, muy inferior a la observada en plantas inoculadas con la cepa salvaje.

Todas las plantas presentaban un color amarillento en las hojas y un desarrollo limitado por la falta de Nitrógeno. Este tono amarillento se acentúa

en las plantas control y en las plantas inoculadas con la cepa 1021C2$^+$, debido a su capacidad limitada de fijación de Nitrógeno.

El hecho de que haya disminuido la fijación de Nitrógeno en las plantas inoculadas con la cepa 1021C2$^+$ respecto a las inoculadas con la cepa salvaje, aunque esta disminución no ha sido menor que en las plantas control, puede deberse a que las bacterias encuentran otra vía de entrada en el interior del nódulo, quizás mediante espacios intercelulares, aunque la razón principal es la desorganización que se observa en el interior nodular en estos nódulos de plantas inoculadas con 1021C2$^+$. La mayor parte de los nódulos observados son aberrantes e infectivos, aunque existen algunos de constitución normal pero con una efectividad mucho menor de la esperada. La observación en raras ocasiones de algunas células con simbiosomas en el interior de los nódulos desorganizados típicos de la sobreexpresión de esta celulasa, parece corroborar esta hipótesis (ver Capítulo 4).

2. 2. Fenotipo presentado por plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con su cepa homóloga *E. medicae* WSM419 y sus derivados WSM419C2$^+$ y WSM419EMC$^+$ en ausencia de Nitrógeno.

Además de los ensayos realizados con la cepa modelo *E. meliloti* 1021 y su derivado productor de celulasa CelC2 de *Rhizobium,* realizamos los ensayos de invernadero para comprobar el desarrollo vegetal de las plantas de *M. truncatula* inoculándolas con su cepa homóloga *E. medicae* WSM419 y sus derivados sobreproductores de CelC2 rizobiana y de su ortóloga en la misma cepa, la nombrada en este trabajo como WSM419EMC$^+$.

Las plantas recogidas después de tres meses cultivadas bajo condiciones controladas de invernadero presentaban un aspecto bastante saludable, exceptuando el control sin inocular (figura 77), con respecto al color de las hojas.



Figura 77. Fenotipo mostrado por las plantas de *Medicago truncatula*, control sin inocular (A); inoculadas con *E. medicae* WSM419 (B); inoculadas con el mutante sobreproductor WSM419C2$^+$ (C) y WSM419EMC$^+$ (D) en ausencia de Nitrógeno.

Las plantas inoculadas con la cepa WSM419C2$^+$ (figura 77 C), que expresa heterólogamente la celulasa CelC2 de *Rhizobium*, presentan un desarrollo menor respecto a las plantas inoculadas con la cepa silvestre (figura 77 B), siguiendo la tendencia de los ensayos con *Trifolium repens* y *Medicago sativa* e inoculadas con las cepas superproductoras de la celulasa CelC2 (Robledo TD, 2010). La disminución del desarrollo vegetal en estas plantas inoculadas con el derivado WSM419C2$^+$ se corresponde con los datos de longitud (figura 78 A) y peso seco (figura 78 B) de la parte aérea recogidos a lo largo de 4 experimentos independientes, mostrándose una disminución estadísticamente significativa en dichos valores con respecto a la cepa silvestre, aunque no llega a los valores presentados por las plantas control que no fueron inoculadas pero se trataron y/o fertilizaron de la misma manera.

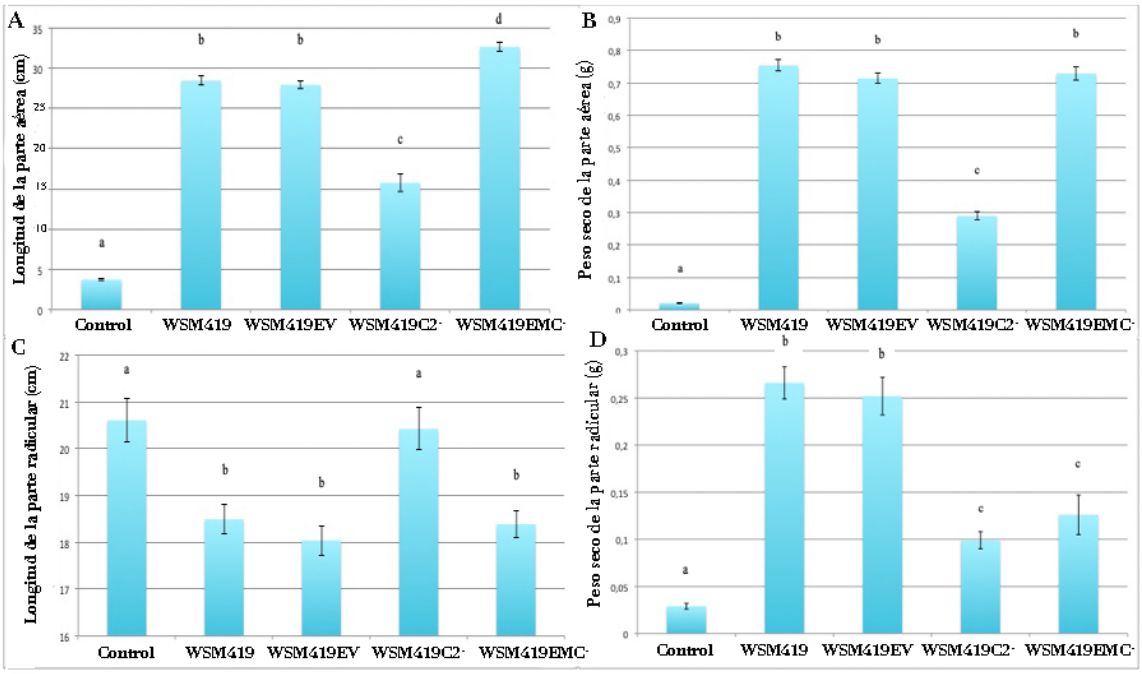


Figura 78. Longitud de la parte aérea (A), peso seco de la parte aérea (B), longitud de la parte radicular (C) y peso seco de la parte radicular (D) de plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con *E. medicae* WSM419 y sus derivados sobreproductores y cultivadas bajo condiciones controladas de invernadero durante tres meses y abonadas con solución de Fâhraeus sin Nitrógeno. La gráfica se realizó con valores medios representativos de cuatro experimentos independientes de al menos 30 plantas cada uno. Las barras de error representan el error estándar. Los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos (Test de Fischer $p \geq 0{,}01$).

Las plantas control sin inocular presentan valores muy bajos que son significativamente inferiores a todos los demás tratamientos. Además, incluimos un tratamiento con el derivado "empty vector" de la cepa salvaje, que se comportó de la misma manera que la propia cepa salvaje en todas las ocasiones. En las plantas inoculadas con la cepa superproductora de la propia celulasa de WSM419 (WSM419EMC$^+$) se observa un aumento significativo en la longitud de la parte aérea (figura 78 A) respecto a los demás tratamientos, inclusive la inoculación con la cepa silvestre. Estas plantas tienen una mayor longitud, pero no son tan frondosas como las inoculadas con la cepa salvaje. Aún así el peso seco (figura 78 B) de la parte aérea de estas plantas no difiere mucho, es más no muestra diferencias significativas con las plantas inoculadas con la cepa salvaje. Esta mayor longitud de la planta puede ser debida al incremento en producción de hormonas, como el ácido indolacético, al inocular con cepas con potencial PGPR. Este hecho será discutido ampliamente en el apartado "Discusión general".

En cuanto a la longitud de las raíces (figura 78 C) de *M. truncatula* en estos ensayos, podemos observar que las plantas control sin inocular y las inoculadas con el derivado superproductor de la celulasa rizobiana muestran una mayor longitud de la raíz, probablemente debido a la ausencia de fijación

de Nitrógeno y por ende, la carencia de algunos nutrientes lo que provoca que la raíz crezca en longitud para hallar los nutrientes de los que no dispone.

Este aumento en la longitud de la raíz es estadísticamente significativo respecto a los datos obtenidos en las mediciones de plantas inoculadas con las cepas salvaje, "empty vector" y superproductora de su propia celulasa, que presentan valores muy próximos entre ellas. Sin embargo, el peso de la parte radicular es significativamente mayor en las plantas inoculadas con la cepa silvestre que en el resto de los tratamientos (figura 78 D).

En cuanto al contenido en Nitrógeno observamos que existen diferencias estadísticamente significativas entre todos los tratamientos (figura 79).

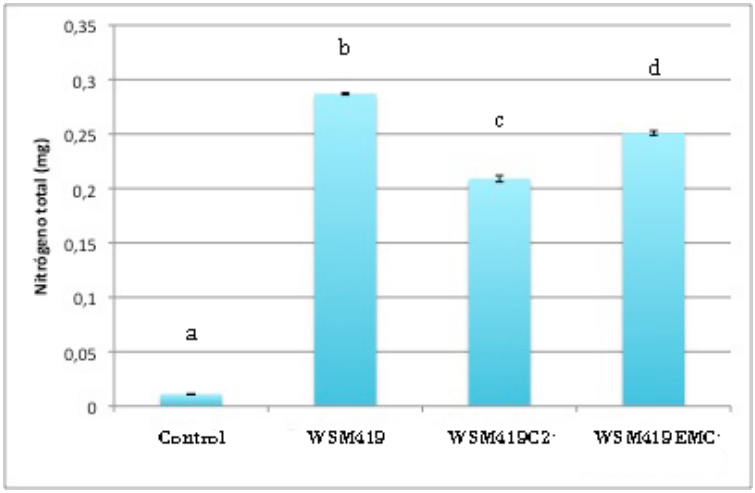


Figura 79. Contenido en Nitrógeno de plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con *E. medicae* WSM419 y sus derivados sobreproductores y cultivadas en invernadero durante tres meses y abonadas con solución de Fâhraeus sin Nitrógeno. La gráfica se realizó con valores medios representativos de dos experimentos independientes de al menos 30 plantas cada uno. Las barras de error representan el error estándar. Los valores seguidos de la misma letra no son significativos (Test de Fischer $p \geq 0{,}01$).

Las plantas inoculadas con el derivado superproductor de celulasa rizobiana CelC2 tienen un contenido en Nitrógeno inferior al de las plantas inoculadas con la cepa silvestre y las inoculadas con la cepa superproductora de su propia celulasa CelC. Esta tendencia es similar a los datos obtenidos en las demás plantas y sistemas simbióticos, aunque la disminución del contenido en Nitrógeno es menor que la ocurrida en otras interacciones en las que se ha probado el efecto de esta celulasa rizobiana. La diferencia puede radicar en lo efectiva que es *E. medicae* en *M. truncatula* o en un menor grado de desorganización del interior del nódulo, lo que no dificultaría tanto la fijación de Nitrógeno por parte de estas bacterias (ver capítulo 4).

Las plantas inoculadas con la cepa superproductora de su propia celulasa presentan un contenido en Nitrógeno significativamente mayor a las inoculadas con la cepa superproductora de celulasa rizobiana pero

significativamente menor al contenido de plantas inoculadas con la cepa salvaje, suponiendo un paso intermedio entre ellas. En los nódulos de estas plantas (capítulo 4 apartado 3. 2) existen células con simbiosomas fijando Nitrógeno pero también existen muchas células vacías y se observan bacterias no diferenciadas tanto intra como intercelulares. Esta disminución del contenido en Nitrógeno en relación a las plantas inoculadas con la cepa salvaje es probablemente debida a la incompleta funcionalidad de estos nódulos.

El aspecto más saludable de las plantas, la mayor eficiencia en nodulación y el mayor desarrollo de la planta, tanto de la parte aérea como de la parte radicular, entre otras características descritas en los capítulos anteriores, de las plantas inoculadas con *E. medicae* WSM419 respecto de las características presentadas por las plantas inoculadas con *E. meliloti* 1021, se debe a que la cepa *E. medicae* WSM419 es la cepa homóloga de *M. truncatula*. Nuestros datos y los datos presentados por Terpolilli y colaboradores (Terpolilli *et al*., 2008) coinciden, por lo que proponemos que *E. medicae* WSM419 debe ser considerada como cepa modelo, en vez de *E. meliloti* 1021, aceptada actualmente como tal.

3. Desarrollo vegetal en presencia de Nitrógeno

3. 1. Fenotipo presentado por plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con *E. meliloti* 1021 y su derivado *E. meliloti* 1021C2$^+$ en presencia de Nitrógeno.

Para corroborar que el desarrollo vegetal en las plantas inoculadas con la cepa superproductora se ve afectado negativamente por el defecto en la fijación de Nitrógeno en los nódulos de estas plantas, nos propusimos realizar los ensayos anteriores (apartado 1. 1) esta vez en presencia de Nitrógeno.

Después del período de tres meses bajo condiciones controladas de invernadero, recogimos las plantas y tomamos las medidas oportunas, medidas que se detallan a continuación.

En este caso, las plantas mostraban un desarrollo similar a simple vista en todos los tratamientos y estaban bastante igualadas en longitud y frondosidad. En la figura 80 se puede observar que las plantas inoculadas con la cepa salvaje presentaban una tendencia a un porte ligeramente superior, las plantas control eran menos frondosas y las plantas inoculadas con la cepa superproductora CelC2$^+$ eran más frondosas pero con menor longitud en la parte aérea (Fig. 80 A-C).



Figura 80 Fenotipo mostrado por las plantas de *Medicago truncatula*, control sin inocular (A), inoculadas con *E. meliloti* 1021 (B) e inoculadas con el mutante sobreproductor *E. meliloti* 1021C2^{+} (C) en presencia de Nitrógeno.

En general, las plantas presentan una coloración verde fuerte en las hojas y un tamaño similar entre los tratamientos si bien se observó que las plantas inoculadas con la cepa 1021 presentaban un desarrollo ligeramente mayor, sobre todo en longitud de la parte aérea, como comprobamos en los datos de las medidas de dicha longitud (figura 81 A), respecto a las plantas control sin inocular y a las plantas inoculadas con la cepa 1021C2^{+}, con lo cual podemos pensar que la cepa 1021 pueda estar ejerciendo una acción PGPR o promotora del crecimiento vegetal.

Sin embargo, consideramos esta hipótesis poco probable, por las características inherentes a esta cepa, ya que la interacción *Ensifer meliloti* 1021 - *Medicago truncatula* se ha demostrado ineficiente tanto en este trabajo, como en los trabajos anteriormente publicados por otros grupos de investigación. No obstante, en un futuro analizaremos los mecanismos PGPR de esta cepa y

de sus derivados, en el caso de que hubiese diferencias, sería un tema muy interesante a tratar.

Las pequeñas diferencias observadas se pueden ver en los datos de longitud aérea (figura 81 A), aunque en los datos del peso de la parte aérea (figura 81 B) no se mantienen estas diferencias por lo que se ve contrarrestada longitud con peso seco, siendo el peso seco de la parte aérea el parámetro más importante a analizar en forrajeras.

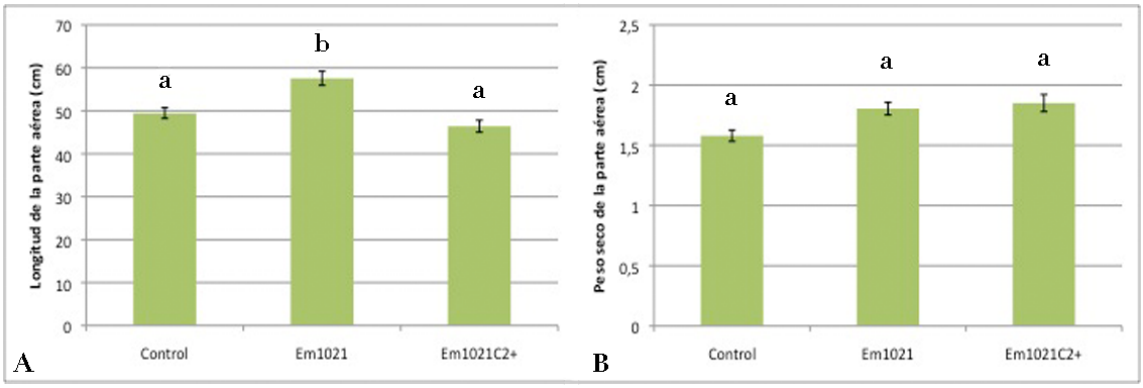


Figura 81. Longitud de la parte aérea (A) y peso seco de la parte aérea (B) de plantas de *Medicago truncatula* cultivadas bajo condiciones controladas de invernadero durante tres meses y abonadas con solución de Fâhraeus suplementada con Nitrógeno. La gráfica se realizó con valores medios representativos de dos experimentos independientes de al menos 30 plantas cada uno. Las barras de error representan el error estándar. Los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos (Test de Fischer $p \geq 0{,}01$).

Seguidamente, se observaron diferencias significativas en las medidas de la longitud de la parte radicular (figura 82), aunque sólo el valor obtenido para las plantas control es significativamente menor a los valores obtenidos para los dos tratamientos inoculados con una u otra cepa.

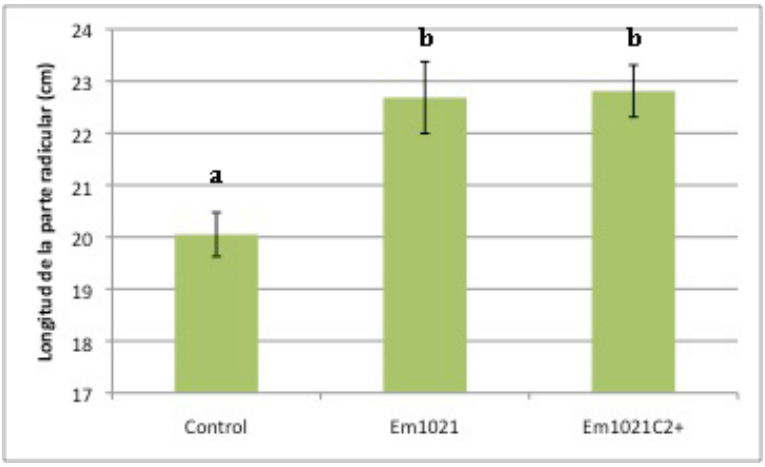


Figura 82. Longitud de la parte radicular de plantas de *Medicago truncatula* cultivadas bajo condiciones controladas de invernadero durante tres meses y abonadas con solución de Fâhraeus suplementada con Nitrógeno. La gráfica se realizó con valores medios representativos de dos experimentos independientes de al menos 30 plantas cada uno. Las barras de error representan el error estándar. Los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos (Test de Fischer $p \geq 0{,}01$).

Las diferencias encontradas en la longitud de la parte aérea de las plantas cultivadas en presencia de Nitrógeno en la solución fertilizante entre las plantas inoculadas con la cepa 1021C2^{+} respecto de la cepa silvestre no se mantienen en el peso seco, medida más importante en forrajeras, donde no existen diferencias significativas entre los dos tratamientos y las plantas control sin inocular. Estos datos corroboran que la disminución del desarrollo vegetal en las plantas crecidas en ausencia de Nitrógeno se debe a la poca eficiencia de los nódulos presentes en las plantas inoculadas con la cepa superproductora de la celulasa CelC2.

3. 2. Fenotipo presentado por plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con su cepa homóloga *E. medicae* WSM419 y sus derivados WSM419C2^{+} y WSM419EMC^{+} en presencia de Nitrógeno.

Al igual que hicimos para analizar si el desarrollo vegetal en las plantas inoculadas con la cepa 1021C2^{+} se ve afectado negativamente por el defecto en la fijación de Nitrógeno en los nódulos de estas plantas, realizamos el mismo experimento en presencia de Nitrógeno para las plantas inoculadas con *E. medicae* WSM419 y sus derivados.

En este caso, las plantas mostraban un porte similar en todos los tratamientos y estaban bastante igualadas, tanto en longitud de la parte aérea, raíz y frondosidad, al igual que el verdor en sus hojas, el cual era bastante homogéneo, como se puede observar en la imagen (figura 83).

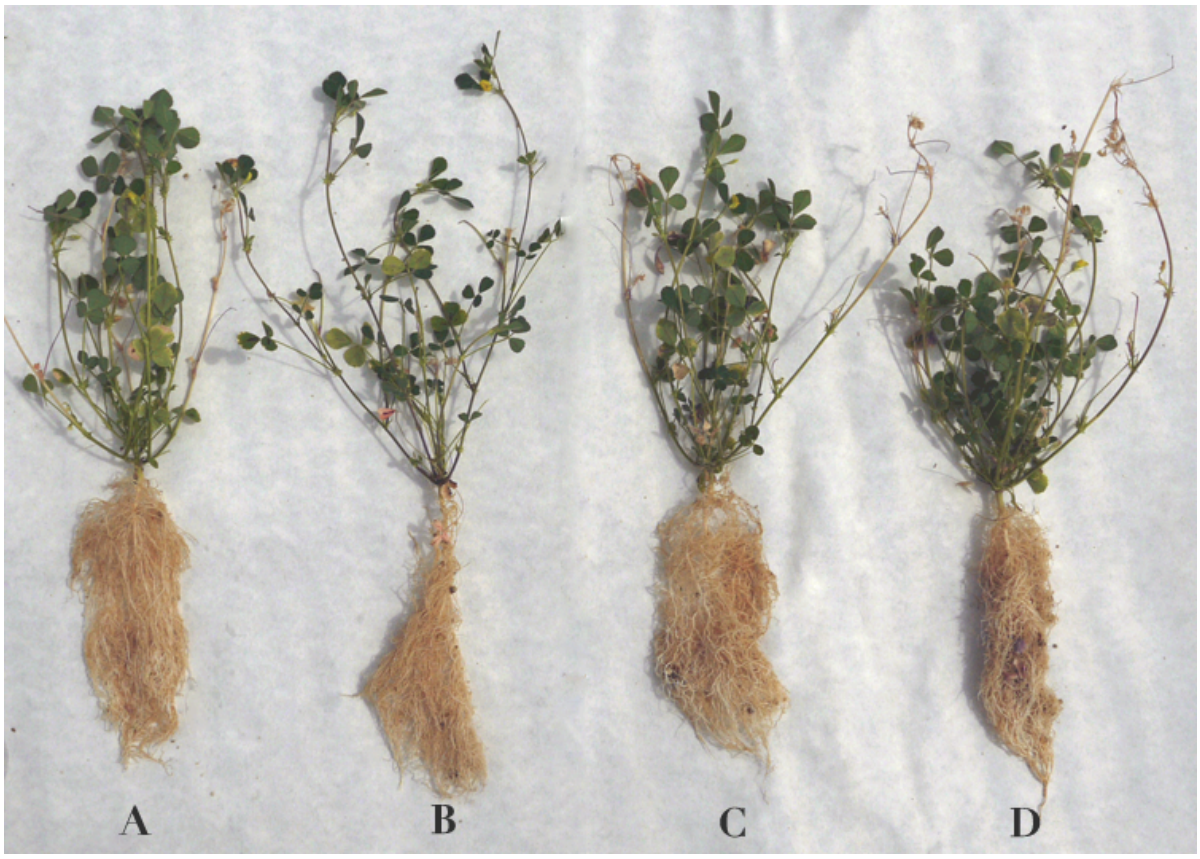


Figura 83. Fenotipo mostrado por las plantas de *Medicago truncatula*, control sin inocular (A), inoculadas con *E. medicae* WSM419 (B) e inoculadas con el mutante sobreproductor WSM419C2^{+} (C) y WSM419EMC^{+} en presencia de Nitrógeno.

En cuanto a las medidas tomadas de longitud aérea (figura 84 A), peso seco de la parte aérea (figura 84 B), longitud de la parte radicular (figura 84 C) y peso seco de la parte radicular (figura 84 D) en todas ellas se observan unos valores bastante similares que en ningún caso resultaron estadísticamente significativos.

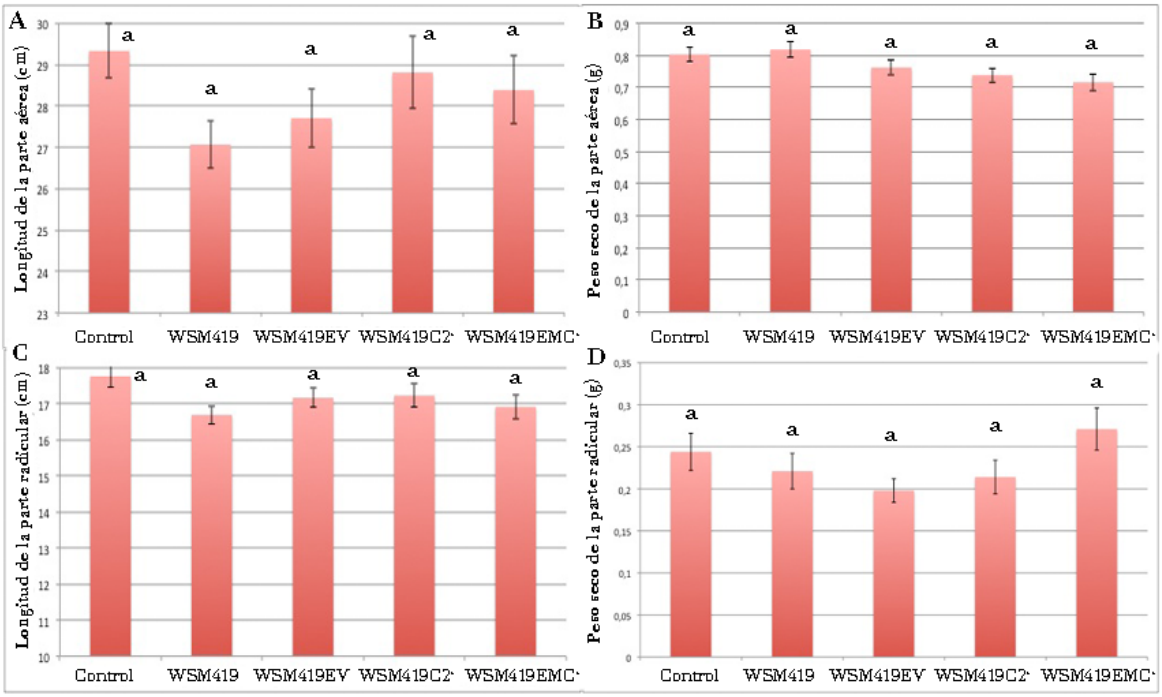


Figura 84. Longitud de la parte aérea (A), peso seco de la parte aérea (B) y longitud de la parte radicular (C) de plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con *E. medicae* y sus derivados sobreproductores cultivadas bajo condiciones controladas de invernadero durante tres meses y abonadas con solución de Fâhraeus suplementada con Nitrógeno (NH_4NO_3). La gráfica se realizó con valores medios representativos de dos experimentos independientes de al menos 30 plantas cada uno. Las barras de error representan el error estándar. Los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos (Test de Fischer $p \geq 0{,}01$).

Estos datos corroboran que la disminución del desarrollo vegetal en las plantas crecidas en ausencia de Nitrógeno se deben a la diferente eficiencia de los nódulos presentes en las plantas inoculadas con las distintas cepas utilizadas.

4. Análisis cuantitativo de elementos esenciales mediante Ionómica.

La mejora en la fijación biológica de Nitrógeno se considera uno de los puntos clave en el objetivo global de reducción de fertilizantes aunque se deben considerar otros nutrientes que en ocasiones tienen una mayor demanda por las plantas y son vitales para obtener altos rendimietnos de cultivo.

Los elementos esenciales se clasifican como macronutrientes y micronutrientes de acuerdo a la concentración a la que aparecen en los tejidos vegetales y que la planta necesita para su correcto desarrollo (Epstein and

Bloom, 2005). Así entre los macronutrientes podemos encontrar el nitrógeno, el calcio, el fósforo, el potasio, el azufre y el silíceo mientras que en los micronutrientes podemos encontrar el manganeso, el sodio, el hierro, entre otros. En estos últimos, la cantidad en el medio y en la planta debe ser muy pequeña y está muy regulado ya que altas concentraciones de micronutrientes pueden originar toxicidad. Las funciones de algunos de éstos micronutrientes son esenciales, como por ejemplo el hierro (Fe) que forma parte de muchas moléculas esenciales como la leg-hemoglobina y la nitrogenasa.

Los microorganismos, sobre todo los promotores de crecimiento vegetal, son los que ayudan a la planta a la asimilación de dichos oligoelementos con el fin de mejorar su desarrollo. Los PGPR son los microorganismos más utilizados para la mejora de los cultivos por lo que, debido a la posibilidad de que *E. medicae* WSM419 pueda actuar también como PGPR, en este apartado, decidimos analizar mediante ionómica el contenido de algunos de los elementos esenciales en las partes aéreas de *Medicago truncatula* inoculadas con las cepas WSM419 y sus derivados que sobreexpresan tanto la celulasa CelC2 de *Rhizobium* como la celulasa CelC de *Ensifer*. Se analizaron algunos de los elementos esenciales en plantas inoculadas con las cepas anteriormente citadas y fertilizadas tanto en ausencia como en presencia de Nitrógeno, que resultaron en los valores mostrados en la tabla 35.

Tabla 35. Valores expresados en miligramos por gramos de planta analizado en los principales elementos esenciales analizados en la parte aérea de *M. truncatula* inoculadas con WSM419, WSM419C2$^+$ y WSM419EMC$^+$ en presencia y ausencia de Nitrógeno. Los valores representan la media ± el error estándar. Valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente significativos según el test LSD protegido de Fisher (p≥0,05).

mg/g muestra		**Ca**	**K**	**Fe**	**Mg**	**Mn**	**Na**	**P**
Con Nitrógeno	**Control**	5,80±0,33 a	6,75±0,43a	0,048±0,001 a	4,25±0,29 a	0,025±0,002 a	1,47±0,11 a	3,12±0,23 a
	WSM419	7,02±1,30 a	5,70±0,65a	0,051±0,011 a	3,85±0,57 a	0,038±0,006 a	1,81±0,32 a	2,83±0,44 a
	WSM419C2$^+$	13,33±0,70 b	13,28±1,40b	0,087±0,002 b	6,63±0,07 b	0,062±0,006 b	2,51±0,17 a	6,33±0,20 b
	WSM419EMC$^+$	12,95±0,60 b	13,11±0,78b	0,096±0,007 c	7,28±0,32 c	0,060±0,003 b	3,54±0,31 b	6,14±0,161 b
Sin Nitrógeno	**Control**	3,41±0,65 a	4,48±0,76 a	0,014±0,001 a	1,77±0,35 a	0,026±0,004 a	0,55±0,06 a	3,98±0,65 a
	WSM419	7,64±3,18 a	11,01±4,66 a	0,069±0,028 a	6,20±2,28 b	0,044±0,015 a	4,69±2,08 b	3,83±1,49 a
	WSM419C2$^+$	13,65±2,75 b	19,16±4,32b	0,137±0,003 b	7,35±0,9 c	0,051±0,014 a	6,08±1,24 b	8,26±1,61 b
	WSM419EMC$^+$	9,80±2,07 b	10,65±1,94 a	0,087±0,021 a	5,07±0,80 ab	0,0030±0,00a	2,93±0,67 b	5,72±1,12 a

En líneas generales para los elementos esenciales analizados existe un incremento en los valores de las plantas inoculadas con las cepas transformadas tanto con la celulasa CelC2 de *Rhizobium* como con la celulasa CelC de *Ensifer*.

En ausencia de Nitrógeno existe un aumento significativo en los valores de la cepa transformada con CelC2 de *Rhizobium* respecto de la cepa silvestre, salvo en el manganeso (Mn) y el sodio (Na). Por el contrario, sólo existen diferencias significativas en la inoculación con las cepas transformadas con la celulasa CelC de *Ensifer* en el caso del calcio (Ca).

En presencia de Nitrógeno se observa un incremento significativo en las cepas transformadas con ambas celulasas respecto de la cepa silvestre, salvo en los valores de sodio (Na) de las plantas inoculadas con la cepa WSM419C2^{+}.

Además, al analizar comparativamente los valores resultantes para las plantas inoculadas con la cepa silvestre frente a los valores de las plantas control sin inocular, no observamos diferencias significativas en las plantas cultivadas en presencia de Nitrógeno, dato que se mantiene en ausencia de Nitrógeno excepto en el caso del sodio (Na) y del magnesio (Mn).

Estos datos nos indican que existe un incremento en la concentración de los elementos esenciales analizados tanto en condiciones de ausencia como en presencia de Nitrógeno. Estudios posteriores deben ser realizados para profundizar en este interesante resultado.

CAPÍTULO 6

Expresión heteróloga de la celulasa CelC2 en raíces de *M. truncatula* y análisis del fenotipo simbiótico resultante al ser inoculadas con *E. meliloti* 1021.

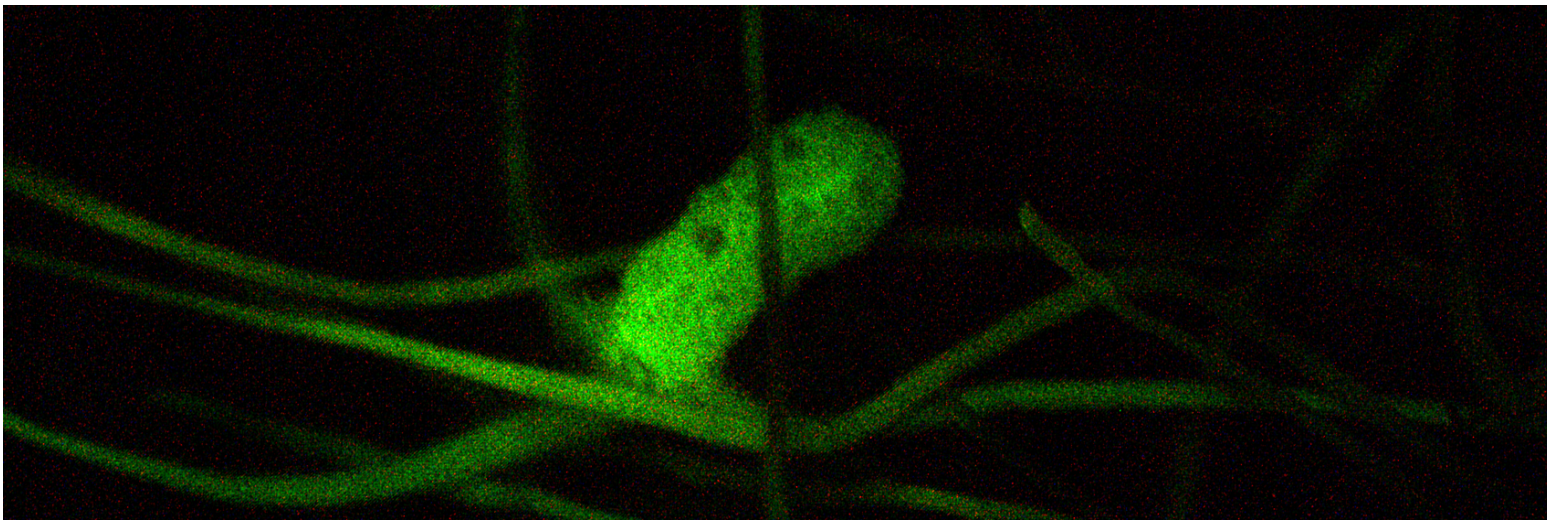


Imagen: Raíz y nódulo de *M. truncatula* transformada con el gen *celC* e inoculada con *E. meliloti* 1021. La expresión de GFP en toda la raíz y nódulo implica que está completamente transformada.

1. Introducción

Con el fin de dilucidar cómo podría afectar al desarrollo vegetal una expresión heteróloga de la celulasa bacteriana CelC2 en plantas leguminosas, decidimos transformar raíces de *Medicago truncatula* con el gen *celC*, que codifica para dicha celulasa.

La celulasa bacteriana CelC2 es una endoglucanasa anclada a la célula, que según estudios recientes (Robledo *et al.,* 2012), está implicada en la biosíntesis de celulosa bacteriana, teniendo unos sustratos similares (lipooligosacáridos) a los que tienen las endoglucanasas ancladas a membrana involucradas en la biosíntesis de celulosa vegetal, por ejemplo las celulasas KORRIGAN en *Arabidopsis* y en varias leguminosas.

El gen *celC* forma parte del denominado operón *celABC o bcsABZ ("bacterial cellulose synthesis")*, que está implicado en la biosíntesis de celulosa y está presente en la mayoría de los miembros de la familia Rhizobiaceae, además de en otros géneros de eubacterias como, por ejemplo, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella y Gluconoacetobacter.*

La celulosa es uno de los biopolímeros más abundantes en nuestro planeta. Posee una estructura de homopolímero formado por n moléculas de ß-glucopiranosa unidas por enlaces ß1,4-O-glucosídico. Además de su importancia en agricultura, ya que representa aproximadamente el 30% del peso seco de la pared celular de las células vegetales, siendo también el componente más abundante en su composición, la celulosa es esencial en la industria maderera, papelera, textil y química.

La síntesis de celulosa no es un proceso exclusivamente vegetal, sino que existen muchos seres vivos que la producen, como *Gluconacetobacter xylinum* y *Rhizobium radiobacter* (antiguamente *Agrobacterium tumefaciens,* ver tabla 1 de la Introducción general), modelos de producción de celulosa en procariotas (Ross et al., 1987; Mathysse et al., 1995) y en eucariotas, como en el modelo para el estudio de paredes celulares *Physcomitrella patens* o la propia *Arabidopsis thaliana*, planta modelo por excelencia (McCarthy *et al*., 2014; Doblin *et al.,* 2002).

2. Similitudes en la biosíntesis de celulosa entre plantas y bacterias.

El mecanismo de biosíntesis de celulosa en bacterias y plantas no se conoce en detalle, aunque cada vez se profundiza más en su estudio, sobre todo, en el caso de las bacterias, debido a la implicación de la celulosa y otros polisacáridos bacterianos en el establecimiento de los biofilms en superficies tanto bióticas como abióticas. Aunque las rutas metabólicas de síntesis de celulosa son muy complejas y altamente reguladas, comparten algunas características, por ejemplo la celulasa CelC2 bacteriana y las proteínas

KORRIGAN en plantas, son dos endoglucanasas implicadas en la biosíntesis de celulosa y ambas son proteínas ancladas a la superficie celular y/o de membrana (Robledo *et al.,* 2012; Peng *et al*., 2002). Estas proteínas KORRIGAN están descritas en *Arabidopsis thaliana* como endoglucanasas localizadas en la membrana plasmática y son requeridas para un ensamblaje normal de la pared celular y para la elongacion de las células vegetales. Una mutación en el gen *kor* resulta en defectos en la elongación que pueden estar asociados a cambios en la composición o estructura de la celulosa y xiloglucanos de la pared celular primaria de células del hipocotilo (Nicol *et al*., 1998) así como de tricomas y sus células de soporte (Molhoj *et al*., 2001). Esta endoglucanasa, su ortólogo Cel3 en tomate (Brummel *et al*., 1997) y algunos otros ortólogos en hongos (Van den Wymelenberg *et al*., 2002) son ejemplos de endoglucanasas de membrana que están implicadas en la biosíntesis de celulosa, al igual que las descritas en *Agrobacterium* y *Rhizobium* (Matthysse *et al*., 1995; Ausmees *et al.,* 1999; Robledo *et al*., 2008).

En el caso de la endoglucanasa o celulasa CelC2, una mutación en el gen *celC*, resulta en la exagerada formación de microfibrillas de celulosa en el exterior de las células de *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843, cepa donde se caracterizó la actividad de dicha celulasa. Asimismo, una sobreproducción de esta celulasa en dicha bacteria resulta en la no formación de microfibrillas en el exterior celular (Robledo *et al*., 2012). Sin embargo, al realizar una preparación de dichas bacterias sobreproductoras y tinción con blanco de calcoflúor (fluorocromo que se une a los enlaces ß 1-4) seguida de una observación al microscopio, se observa la aparición de fluorescencia en el interior celular. Esta fluorescencia interior y la no existencia de microfibrillas en el exterior nos hace pensar que existe un fallo en la translocación de los fragmentos que conformarán las microfibrillas externas de celulosa.

Tanto en plantas como en bacterias, las endoglucanasas implicadas en biosíntesis de celulosa se encuentran precedidas de genes que codifican para glicosil sintetasas, como CesA en plantas y CelA en bacterias.

Debido a las similitudes entre glicosil sintetasas y glicosil hidrolasas de plantas y bacterias, decidimos realizar un estudio *in silico* para analizar las posibles similitudes en las secuencias aminoacídicas de dichas enzimas.

2. 1. Estudio *in silico* de las similitudes entre las celulosa sintasas CesA de plantas y CelA de bacterias.

Numerosos estudios y revisiones promueven la existencia de una cercana relación entre plantas y bacterias en lo que se refiere a la biosíntesis de celulosa (Delmer *et al*., 1995; Pear *et al*., 1996). Debido a que la estructura primaria de la celulosa sintetizada por ambos, procariotas y eucariotas, sigue la misma base molecular se acepta que ha habido una evolución desde la biosíntesis de celulosa en bacterias a plantas y algas (Ross *et al*., 1991).

Existen claras evidencias de que los cloroplastos de las plantas vasculares derivan evolutivamente de las cianobacterias, originados por la captura endosimbiótica de éstas, y que algunos de los genes del material genético del cloroplasto se han transferido al genoma nuclear de la planta (Rujan and Martin, 2001), como pudo haber ocurrido con los genes de las celulosa sintasas, enzimas antiguas evolutivamente hablando (Nobles *et al.,* 2001). Este origen se ve apoyado por estudios que relacionan un subgrupo de celulosa sintasas de *Arabidopsis* que poseen similitudes en su secuencia con las celulosa sintasas en procariotas (Taylor *et al.,* 1999). Además, las celulosa sintasas encontradas en algas verdes presentan homología con las encontradas en plantas superiores (Roberts *et al*., 2002).

Las secuencias aminoacídicas de las CesA de plantas comparten regiones con similitud con regiones de las CelA de bacterias (en los organismos modelo de biosíntesis de celulosa *A. xylinum* y *R. radiobacter/A. tumefaciens*, sobre todo), concretamente cuatro motivos catalíticos D, DxD, D, Q/RxxRW, altamente conservados entre las enzimas que sintetizan los diversos tipos de (1, 4) ß D-glucanos, como las glicosil transferasas (GT) (Saxena *et al.,* 1995; Carpita, 2011).

Estas similitudes encontradas en la biosíntesis de celulosa bacteriana y vegetal nos hicieron plantearnos la posibilidad de que existan similitudes entre las CelA de *Rhizobium* (*A. tumefaciens* es, de facto, un miembro del género) y las CesA de plantas superiores. Para ello se realizó una búsqueda de secuencias con homología a la secuencia proteica de CelA de *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843, utilizando Phytozome (version v9.1)(Goodstein *et al.*, 2012), que compara la secuencia problema con los genomas secuenciados y anotados de 41 plantas verdes (superiores e inferiores).

El resultado de esta búsqueda, enfrentando CelA a dicha base de datos, arroja un total de 1644 secuencias pertenecientes a 33 familias génicas, en su mayoría anotadas como genes hipotéticos. Sólo en *Medicago truncatula* se encontraron 38 genes con similitud y en *Arabidopsis thaliana* se encontraron 42 genes con similitud, entre ellas las celulasa sintasas CesA1 a CesA10, que poseen un dominio Glicosil Transferasa de la familia 2 (GT2, Pfam03552), característico de las CesA de plantas (Pear *et al*., 1996). Se denominan "*cellulose synthase catalytic subunits*". Además, existen otras celulosa sintasas que tienen otro dominio distinto (Pfam 00535), aunque tambien pertenecientes a las GT2, siendo ésta una familia muy diversa. Las GT2 están implicadas en los procesos metabólicos que transfieren azúcares desde UDP-glucosa, UDP-N-acetilgalactosamina, GDP-manosa o CDP-abequosa a diversos sustratos como celulosa, dolicol fosfato y ácidos teicoicos.

Sin embargo, en las CelA rizobianas (al igual que muchas CelA de otras bacterias), el dominio cambia, siendo Pfam 13641 el dominio predominante, perteneciente a la familia 2 de Glicosil Transferasa putativas ("*glycosil transferase like family 2_3*", GTL2). Son glicosil transferasas putativas

implicadas en la biosíntesis de la cápsula o envuelta bacteriana. Además, existe un dominio de unión a di-GMP cíclico (Pfam 07238) denominado PilZ (figura 85).

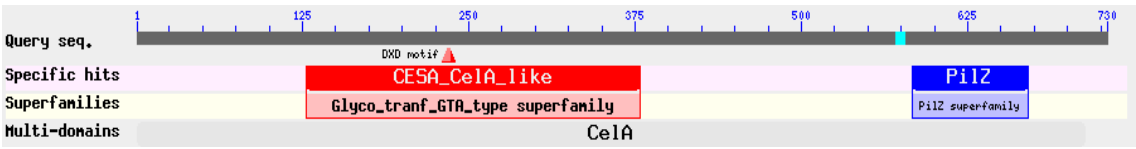


Figura 85. Representación esquemática de los dominios PF13641 y PF07238, correspondientes a la superfamilia Glicosil Transferasa putativa 2 (CelA, rojo) y a PilZ (dominio de unión a di-GMP cíclico), respectivamente, que existen en la celulasa CelC2 de *Rhizobium*. BLASTP.

En este caso de las celulosa sintasas, podemos concluir que existen similitudes en la función que tienen algunas de ellas, sobre todo con las CesA, descritas principalmente en *Arabidopsis*, en algas verdes unicelulares como *Chlamydomonas reinhardthii* o *Coccomyxa subellipsoidea* y también existen homólogos en otras plantas superiores como por ejemplo en *Gossypium hirsutum* y en *Populus tremula*. Además hay ciertas similitudes (54% de secuencia aminoacídica) con celulosa sintasas descritas en cianobacterias, como por ejemplo *Leptolyngbya boryana*. También existen similitudes a nivel de secuencia aminoacídica, con lo que podemos establecer una posible relación evolutiva entre ellas, aunque para asegurarse se debería realizar otras búsquedas, teniendo en cuenta el lugar de expresión y la localización subcelular de dichas glicosil transferasas.

2. 2. Estudio *in silico* de las similitudes entre las endoglucanasas KORRIGAN de plantas y CelC de bacterias.

Partiendo de la hipótesis en la que las celulasas CelC y las KORRIGAN tienen la misma función y que ambas tienen la misma localización celular, ancladas a las membranas de las células, quisimos realizar análisis *in silico* de la misma forma que en el apartado anterior. Además, las CesA y CelA deben ir acompañadas de otras enzimas accesorias que completan el complejo de biosíntesis de celulosa, añadiendo oligómeros, transfiriendo y/o translocando las cadenas de celulosa al exterior celular, formando las microfibrillas de celulosa, ocurriendo así tanto en plantas como en bacterias (Delmer &Amor, 1995; Pear *et al*., 1996; Doblin *et al.,* 2002; Carpita, 2011). Por ejemplo, en bacterias los genes *celA* y *celC* se encuentran en un operón, denominado *celABC* y su expresión conjunta es necesaria para la correcta síntesis de celulosa bacteriana (Matthysse *et al*., 1995; Robledo *et al*., 2012).

Las endoglucanasas CelC y KORRIGAN pertenecen al grupo de las Glicosil Hidrolasas (GH). Las Glicosil Hidrolasas están agrupadas en familias basadas en la similitud que puedan presentar sus secuencias aminoacídicas. Esta clasificación es muy útil para predecir las funciones y la especificidad de sustrato de nuevas proteínas identificadas. Esta agrupación se puede hacer extensiva a las familias de Glicosil Transferasas (Henrissat and Bairoch, 1996; Henrissat and Davies, 1997).

En las secuencias proteicas de las celulasas CelC de las rizobacterias que manejamos en nuestro grupo de investigación (rizobacterias de los genéros *Rhizobium* y *Ensifer*) predomina el dominio Pfam01270, que se corresponde con Glicosil Hidrolasas pertenecientes a la familia 8 (GH8) (figura 86). Esta familia comprende enzimas con varias actividades conocidas, como endoglucanasas, liquenasas y quitosinasas. Es una familia que está implicada en el metabolismo de carbohidratos, hidrolizando la unión glicosídica entre dos o más carbohidratos o entre un carbohidrato y otra molécula. Esta familia de Glicosil Hidrolasas está presente sobretodo en eubacterias, como por ejemplo, en rizobacterias, actinobacterias y cianobacterias, entre otras, existiendo muy pocos grupos de eucariotas que la contengan.

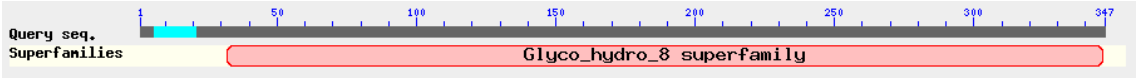


Figura 86. Representación esquemática del dominio Pfam01270, correspondiente a la superfamilia 8 de las Glicosil Hidrolasas (rojo), que existe en la celulasa CelC2 de *Rhizobium*. Se muestra el péptido señal (azul cielo). BLASTP.

Entre estos grupos de eucariotas se encuentran hongos basidiomicetos patógenos de plantas como *Ustilago maydis* y de humanos como *Malassezia sympodialis*. Como curiosidad, estas Glicosil Hidrolasas de la familia 8 también estan presentes en una especie de termita invasora, *Coptotermes formosanus*, que degrada madera y otros materiales que contienen celulosa (Cabrera *et al.*, 2000).

Al realizar una búsqueda en las bases de datos, utilizando las secuencias aminoacídicas de las celulasas CelC de *Rhizobium* y de *Ensifer*, solamente aparecen similitudes con cepas bacterianas. Sin embargo, si las enfrentamos a la base de datos Phytozome, la búsqueda nos devuelve similitud con 2 proteínas, aún no anotadas (hypothetical), del alga verde unicelular *Coccomyxa subellipsoidea*, que pertenecen a la misma familia de las GH (GH8).

Curiosamente, las Glicosil Hidrolasas de la familia 8 no están presentes en la inmensa mayoría de las familias de plantas verdes (Viridiplantae) excepto en un miembro de la división de las clorofitas, el alga verde unicelular *Coccomyxa subellipsoidea* C-169, que fue aislada en la Antártida. Este alga de

vida libre tiene dos glucosidasas en su genoma, ya secuenciado en su totalidad (Blanc *et al*., 2012), con dominio GH8, similares en secuencia proteica (figura 87) con la celulasa CelC2 de *Rhizobium*, como indica la predicción realizada en la base de datos Phytozome. Además, posee otras 22 glicosil hidrolasas pertenecientes a la familia 9. Entre ellas, existen Glicosil Hidrolasas implicadas en la biosíntesis de celulosa, pero no presentan homólogos en los genomas de plantas terrestres. Este alga unicelular utiliza la producción de polisacáridos para adaptarse a condiciones de frío extremo (Blanc *et al.*, 2012).

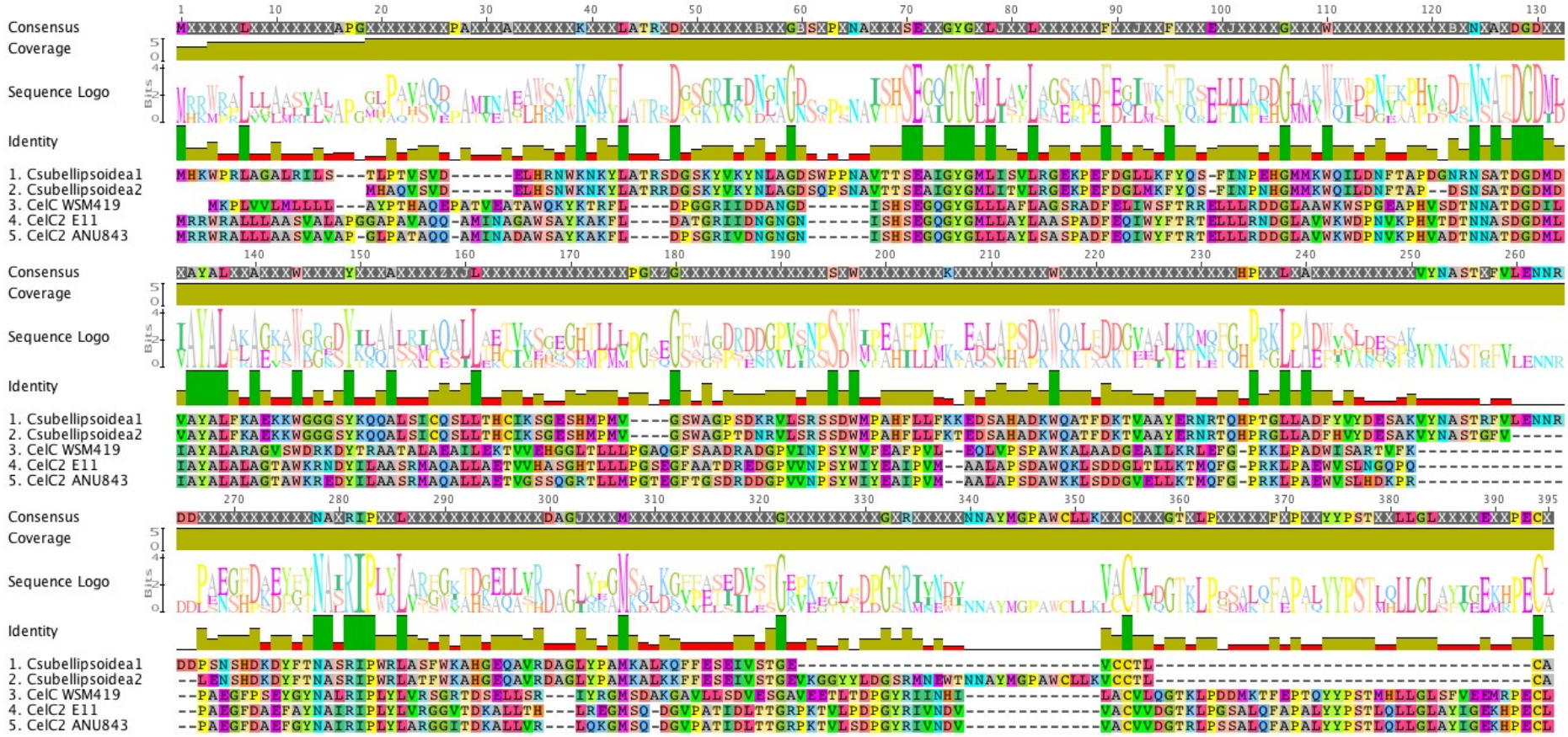


Figura 87. Alineamiento de las secuencias proteicas pertenecientes a las celulasas CelC2 de *Rhizobium* y *Ensifer* y sus homólogos en el alga verde unicelular *Coccomyxa subellipsoidea.* Geneious 4. 8. 4 (MUSCLE alingment). Se observan aminoácidosconservados en verde oscuro (Secuencia Logo única y de mayor tamaño).

Por el contrario, en las plantas terrestres, las endoglucanasas KORRIGAN o similares a éstas encontradas en las bases de datos tienen dominios Pfam00759 de la familia GH9, implicada en el metabolismo de carbohidratos, con actividades que van desde endoglucanasas, celobiohidrolasas y endoxiloglucanasas. Esta es una familia de GH que no parece estar presente en *Rhizobium* aunque sí lo está en bacterias degradadoras de celulosa como las especies pertenecientes a los géneros *Cellulomonas* (*C. fimi, C. flavigena*), *Caldicellulosiruptor* (*C. saccharolyticus, C. lactoaceticus, C. obsidiansis*), *Clostridium* (*C. cellulolyticum*, *C. thermocellum*), *Acetivibrio* (*A. cellulolyticus*); en géneros de bacterias endófitas como *Micromonospora* (*M. aurantiaca*), *Bacillus* (*B. licheniformis*), *Paenibacillus* (*P. mucilaginosus*); y de algunas bacterias patógenas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* y *Vibrio cholerae*. En lo que se refiere a cianobacterias, existen miembros que poseen glicosil hidrolasas de la familia 9, presente en plantas terrestres y bacterias degradadoras de celulosa, como por ejemplo *Cyanobium gracile* PCC6307 y *Synechocystis sp*. PCC6803. Además, existe un miembro de la familia 8 de las glicosil hidrolasas en *Gloeocapsa sp.* PCC7428.

Con estos resultados, podemos concluir que, aunque tengan la misma función endoglucanásica, el estudio *in silico* comparativo entre ellas no nos devuelve ninguna similitud u homología patente, excepto en cianobacterias y en algas verdes unicelulares. Si bien, puede haber otras endoglucanasas más cercanas a la CelC pertenecientes a otras familias de glicosil hidrolasas. Serán necesarios más estudios futuros a este nivel para comprobarlo.

3. Transformación de raíces de *Medicago truncatula* con la celulasa rizobiana CelC2.

Debido a las funciones bioquímicas similares entre las CelC rizobianas y las KORRIGAN vegetales, nos pareció interesante observar cómo afectaba la expresión heteróloga del gen de la celulasa bacteriana CelC2 en la planta.

Una transformación estable en leguminosas requiere entre 4 y 6 meses, aunque este tiempo depende del genotipo seleccionado y del tipo de embriogénesis/organogénesis escogida (*Medicago* handbook). Por ello decidimos transformar raíces de *Medicago truncatula* ya que sólo requiere unas pocas semanas, con el fin de obtener plantas compuestas para estudiar la expresión *in planta* del gen *celC* y sus efectos en el desarrollo nodular y vegetal.

Para abordar este cometido, se realizó una trasformación de raíces mediada por *Agrobacterium rhizogenes, "hairy-root transformation"*. Esta transformación tiene por ventaja su rapidez y eficacia, ya que en pocas semanas podemos obtener raíces transformadas con nuestro gen de interés. Para relizar esta transformación se utilizó *A. rhizogenes* ARqua1, una cepa de virulencia relativamente baja, que permite la formación de raíces

transformadas en cabellera que emerjen de la parte aérea de la planta, la cual no está transformada. Estas plantas compuestas están muy bien adaptadas y estudiadas en lo que se refiere al estudio de interacciones simbióticas, como por ejemplo, nodulación por *E. meliloti* y micorrización (Boisson-Dernier *et al*., 2001).

Para llevar a cabo la transformación de raíces de *Medicago truncatula* con el gen *celC*, propio de *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii ANU843, se clonaron las 1044 pb de las que consta dicho gen en un vector pK7WG2D (Karimi *et al*., 2002) mediante tecnología Gateway. Este vector lleva un cassette de inserción para el gen de interés, que se expresará bajo la acción del promotor constitutivo 35S. Además este vector lleva un gen reportero, que codifica para una proteína verde fluorescente (GFP), que al expresarse constitutivamente por todo la raíz transformada, constituye una buena forma de comprobar si la transformación es efectiva simplemente mediante microscopía de fluorescencia. Esta construcción fue introducida mediante "freeze-thaw" en la cepa ARqua1 de *Agrobacterium rhizogenes*, derivado de *A. rhizogenes* A4T, la cual, como apuntamos anteriormente, produce una proliferación de raíces (raíces en cabellera o "hairy roots") a partir de los sitios de infección de la bacteria. Como control, se utilizó el vector de destino mencionado anteriormente sin el gen *celC* insertado.

Esta transformación de raíces, se llevó a cabo utilizando el protocolo estándar descrito por Boisson-Dernier y colaboradores en 2001 (Boisson-Dernier *et al.,* 2001; Medicago handbook, 2006). La selección del fenotipo deseado, una vez transcurrido el tiempo de crecimiento en placa predeterminado (entre 3 y 4 semanas), se realiza mediante fluorescencia, ya que estas plantas transformadas expresan GFP en toda la raíz, escindiendo las raíces no fluorescentes o aquellas quiméricas, es decir, que contengan zonas fluorescentes y zonas no fluorescentes en la misma raíz.

Posteriormente, las plantas seleccionadas fueron inoculadas con una suspensión de *E. meliloti* 1021 (OD_{600} 0,5), ya que, como no contiene homólogos al gen de la celulasa, hace posible la visualización de la expresión del gen en la planta.

3. 1. Influencia de la celulasa CelC2 en la simbiosis fijadora de Nitrógeno.

Con el objetivo de corroborar los datos obtenidos mediante la expresión heteróloga de la celulasa CelC2 en *Ensifer* y su influencia en la simbiosis fijadora de Nitrógeno con *Medicago* y *Trifolium*, procedimos a transformar raíces de *Medicago truncatula* con el gen *celC* de *Rhizobium* y determinar el fenotipo simbiótico de estas plantas transformadas cuando se inoculan con *E. meliloti* 1021 en ausencia de Nitrógeno.

Tras la inoculación y pasados tres meses de cultivo en invernadero en ausencia de Nitrógeno, las plantas de *Medicago truncatula* transformadas con el gen *celC* de *Rhizobium* (contenido en el vector pKcelC) que codifica para la enzima CelC2, mostraron diferencias significativas en el desarrollo de la planta al ser inoculadas con la cepa 1021 de *E. meliloti*. Las plantas control fueron igualmente transformadas con el mismo vector pero sin tener insertado el gen de la celulasa, pKEV (figura 88).



Figura 88. Fenotipo mostrado por las plantas de *Medicago truncatula* transformadas, de izquierda a derecha, transformadas con el vector pKEV sin inocular (A), transformadas con el vector pKEV e inoculadas con *E. meliloti* 1021 (B), transformadas con el vector pKcelC sin inocular (C) y transformadas con el vector pKcelC inoculadas con *E. meliloti* 1021 (D).

Atendiendo a los datos recogidos, estas plantas transformadas e inoculadas presentan un desarrollo significativamente menor al de las plantas control inoculadas con la misma cepa (*E. meliloti* 1021), como se muestra en los datos de longitud de la parte aérea, longitud de la parte radicular y peso seco

de la parte aérea (figuras 89, 90 y 91). El menor desarrollo presentado por dichas plantas es causado por la existencia de un menor contenido en Nitrógeno total (figura 92).

Esta disminución en el desarrollo de la parte aérea de las plantas transformadas puede ser debida, como en plantas sin transformar inoculadas con la cepa 1021C2^{+}, a la ineficacia en la fijación de Nitrógeno, debido a que no se llegan a formar los simbiosomas típicos (figura 95 F) en la proporción correcta para una fijación eficiente y un normal desarrollo de la planta.

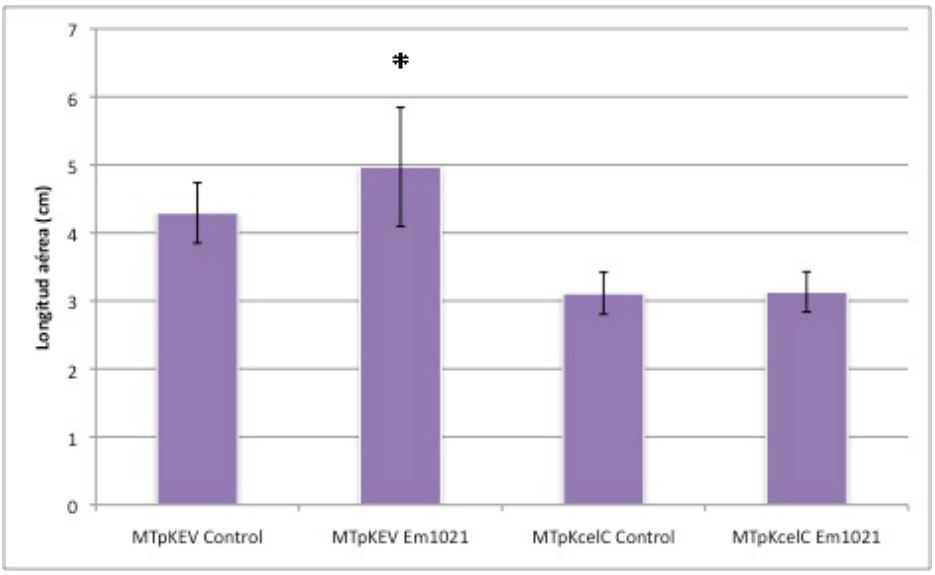


Figura 89. Longitud de la parte aérea de plantas de *Medicago truncatula* con raíces transformadas y cultivadas en ausencia de Nitrógeno. La gráfica representa los valores medios representativos de 3 ensayos independientes de al menos 12 plantas cada uno por cada tratamiento. Las barras de error representan el error estándar. Las barras coronadas con un asterisco representan valores significativos (Fisher's PLSD p ≤0,05).

Estos datos de longitud aérea concuerdan con los datos de peso seco (figura 90), en los que se observa una disminución significativa en las plantas transformadas con el gen *celC* e inoculadas con la cepa 1021.

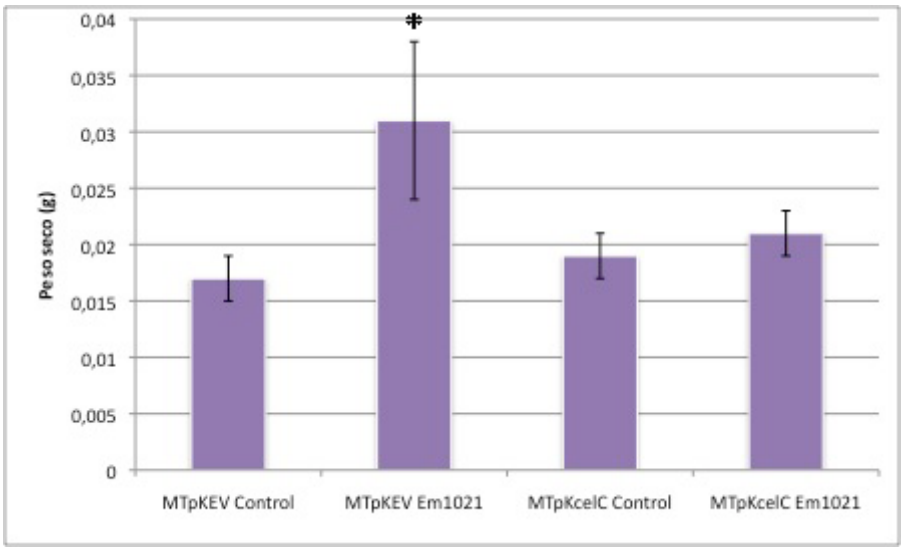


Figura 90. Peso seco de la parte aérea de plantas de *Medicago truncatula* con raíces transformadas y cultivadas en ausencia de Nitrógeno. La gráfica representa los valores medios representativos de 3 ensayos independientes de al menos 12 plantas cada uno por cada tratamiento. Las barras de error representan el error estándar. Las barras coronadas con un asterisco representan valores significativos (Fisher's PLSD p ≤0,05).

Si bien, en lo que se refiere a la longitud de la raíz no observamos diferencias siginificativas en ninguno de los casos. Estas raíces son muy largas pero poco frondosas, posiblemente debido a que la planta, al estar en condiciones de estrés, tiende a aumentar la superficie radicular en busca de una mayor y mejor absorción de nutrientes (figura 91).

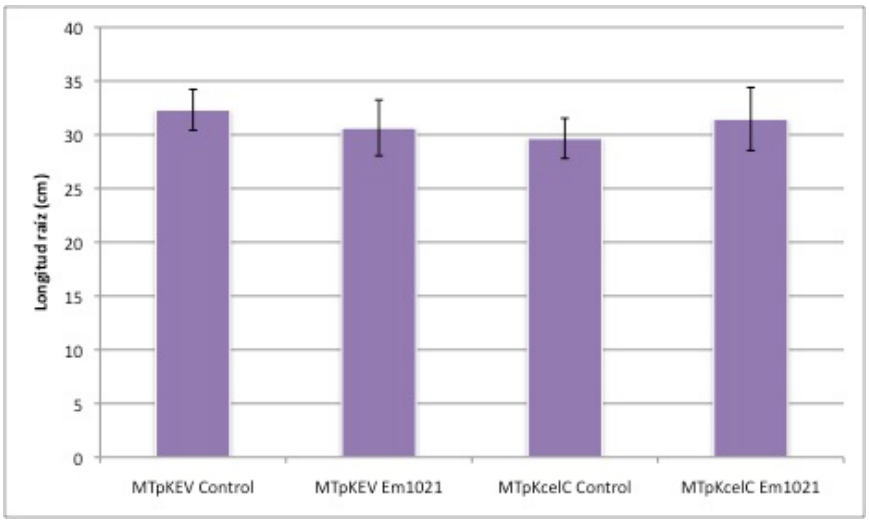


Figura 91. Longitud de la parte radicular de plantas de *Medicago truncatula* con raíces transformadas y cultivadas en ausencia de Nitrógeno. La gráfica representa los valores medios representativos de 3 ensayos independientes de al menos 12 plantas cada uno por cada tratamiento. Las barras de error representan el error estándar. Las barras

coronadas con un asterisco representan valores significativos (Fisher's PLSD p ≤0,05).

Para determinar si esta disminución en el desarrollo era debida al nitrógeno, se procedió a analizar este elemento mediante Ionómica, utilizando un analizador elemental C/N (Flash EA 1112 Series-Leco Truspec). Los resultados obtenidos de Nitrógeno por planta (figura 92) siguen una tendencia similar a los obtenidos en plantas de *M. truncatula* sin transformar e inoculadas con la cepa superproductora 1021C2^{+}.

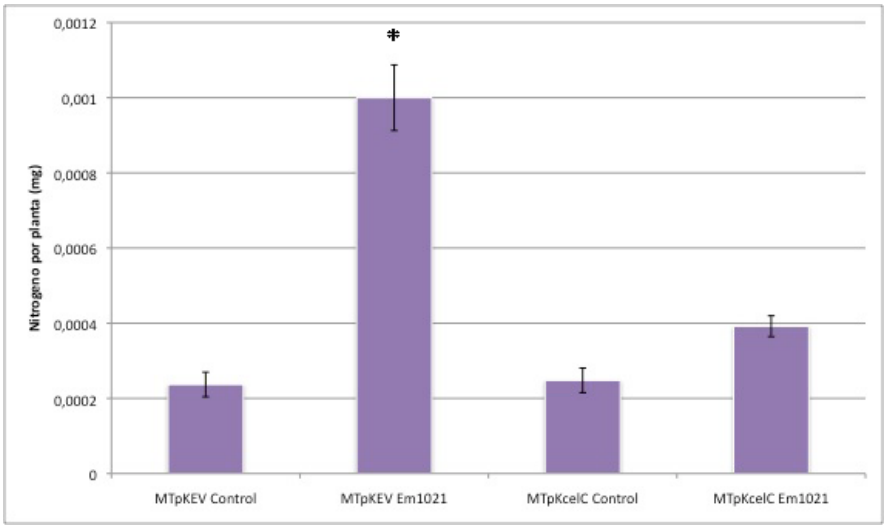


Figura 92. Cantidad de Nitrógeno (mg de Nitrógeno por planta) en plantas de *Medicago truncatula* con raíces transformadas y cultivadas en ausencia de Nitrógeno. La gráfica representa los valores medios representativos de dos ensayos independientes de al menos 12 plantas cada uno por cada tratamiento. Las barras de error representan el error estándar. Las barras coronadas con un asterisco representan valores significativos (Fisher's PLSD p ≤0,05).

El contenido en Nitrógeno en las plantas con raíces transformadas con el gen *celC* e inoculadas es significativamente menor que en el caso de las plantas con raíces transformadas con el vector control e inoculadas con la misma cepa. Aunque no es estadísticamente significativo, el contenido en Nitrógeno en estas plantas es ligeramente mayor que en las plantas transformadas sin inocular, tanto transformadas con el vector control como con el vector con el gen de interés. Este dato nos podría indicar, que aunque es muy deficiente, aún hay un cierto grado de Fijación de Nitrógeno en los nódulos de estas plantas.

4. Infección primaria.

En una primera observación de las raíces transformadas bajo el microscopio óptico, no existe ninguna diferencia entre los pelos radiculares de las plantas transformadas con el vector vacío e inoculadas y las plantas transformadas con el gen *celC* e inoculadas respecto a los fenotipos comunes que aparecen en infección primaria de plantas sin transformar e inoculadas con la misma cepa, es decir, adhesión al pelo radicular (figura 93A), formación de "caps" (figura 93B), curvatura del pelo radicular (figura 93C) y formación del canal de infección (figura 93D). Si bien se observaron algunos "Hot on the Tip" (Hot) y "Redirections At the Tip" (RaT) (figura 93 E) éstos no fueron mayores que en las plantas sin transformar e inoculadas con la misma cepa.

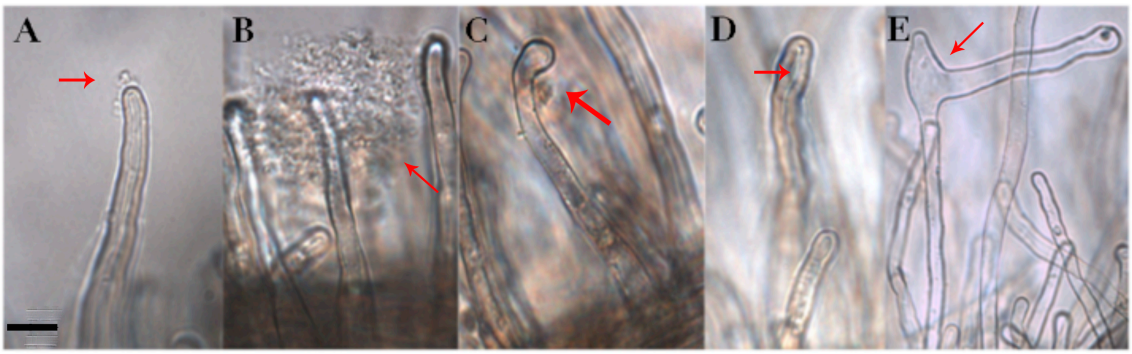


Figura 93 Ejemplos de los fenotipos encontrados en pelos radiculares de plantas transformadas con el vector pKcelC e inoculadas con la cepa *E. meliloti* 1021. A) Inicio de adhesión del rizobio al pelo radicular. B) "Cap". C) Inicio de curling. D) Canal de infección. E) Redirecciones polares. La barra de escala representa 25 µm.

En este sentido, en infección ocurren los fenotipos normales, al igual que en plantas sin transformar inoculadas con la cepa salvaje, por lo tanto la expresión heteróloga de la celulasa CelC2 *in planta* aparentemente no afecta a la infección primaria en *Medicago*. Con este resultado corroboramos la especificidad de hospedador que muestra la celulasa CelC2, confirmando que su no participación en infección primaria en hospedadores no específicos, como la alfalfa, expuesto en el capítulo 3, se corresponde con la no participación en infección primaria cuando se expresa *in planta*.

5. Infección secundaria y desarrollo del nódulo.

En este ensayo también pudimos observar un aumento en el número de nódulos de las plantas transformadas con la celulasa con respecto a la planta sin transformar, si bien estos nódulos son en su mayor parte inefectivos o no alcanzan la madurez. Los resultados muestran una disminución significativa

de la cantidad de nódulos típicos fijadores en las plantas transformadas con la celulasa e inoculadas (figura 94).

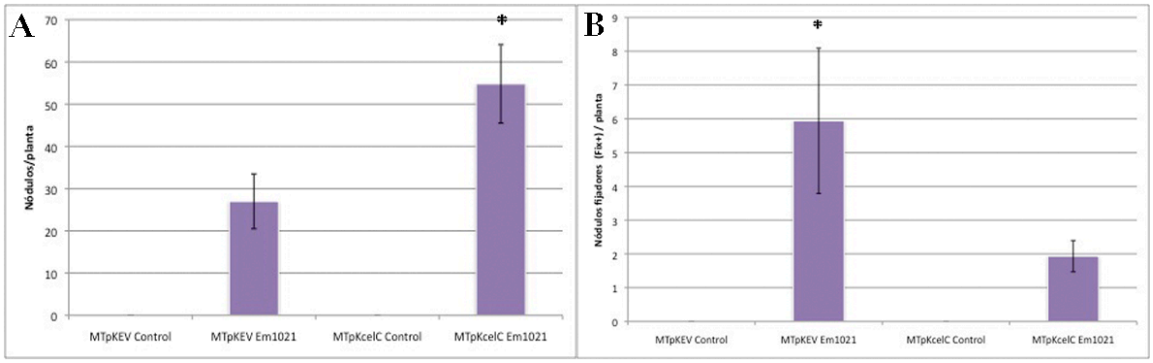


Figura 94. Número total de nódulos en plantas transformadas (A) y número de nódulos fijadores (B). Las gráficas se realizaron con valores medios de los contajes de nódulos de tres experimentos independientes de al menos 12 plantas cada uno. Las barras de error representan la desviación estándar. Los valores seguidos por un asterisco son estadísticamente significativos (Test de Fischer $p \leq 0{,}01$).

El hecho de que exista una mayor cantidad de nódulos totales se debe probablemente a una respuesta de la planta a la ineficacia fijadora de los nódulos. Según Terpolilli y colaboradores (Terpolilli *et al*., 2008), la planta intenta compensar esta deficiencia en fijación de Nitrógeno, incrementando la formación de nódulos. Estos nódulos se distribuyen por toda la raíz y son en su mayor parte inefectivos y no están o están escasamente invadidos, por lo que se quedan en las etapas iniciales del desarrollo (Terpolilli *et al*., 2008). Además, está descrito que mutantes en síntesis de exopolisacáridos en *E. meliloti* 1021 (exo^-) también inducen la formación de nódulos vacíos en raíces de alfalfa (Dickstein *et al.*, 1988).

Para determinar la causa de este aumento en el número de nódulos totales y la disminución en el número de nódulos eficientes, procedimos a analizar la estructura interna de estos nódulos mediante cortes histológicos, donde se observan el mismo tipo de estructuras desorganizadas que en las plantas sin transformar e inoculadas con $1021C2^+$. Esta desorganización probablemente sea debida a la ruptura de la pared vegetal de las células del interior del nódulo por medio de la hidrólisis de la celulosa no cristalina realizada por la celulasa CelC2 (Robledo *et al.*, 2011). Esta degradación es debida a la expresión del gen de la celulasa CelC2 por parte de la planta transformada (figura 95).

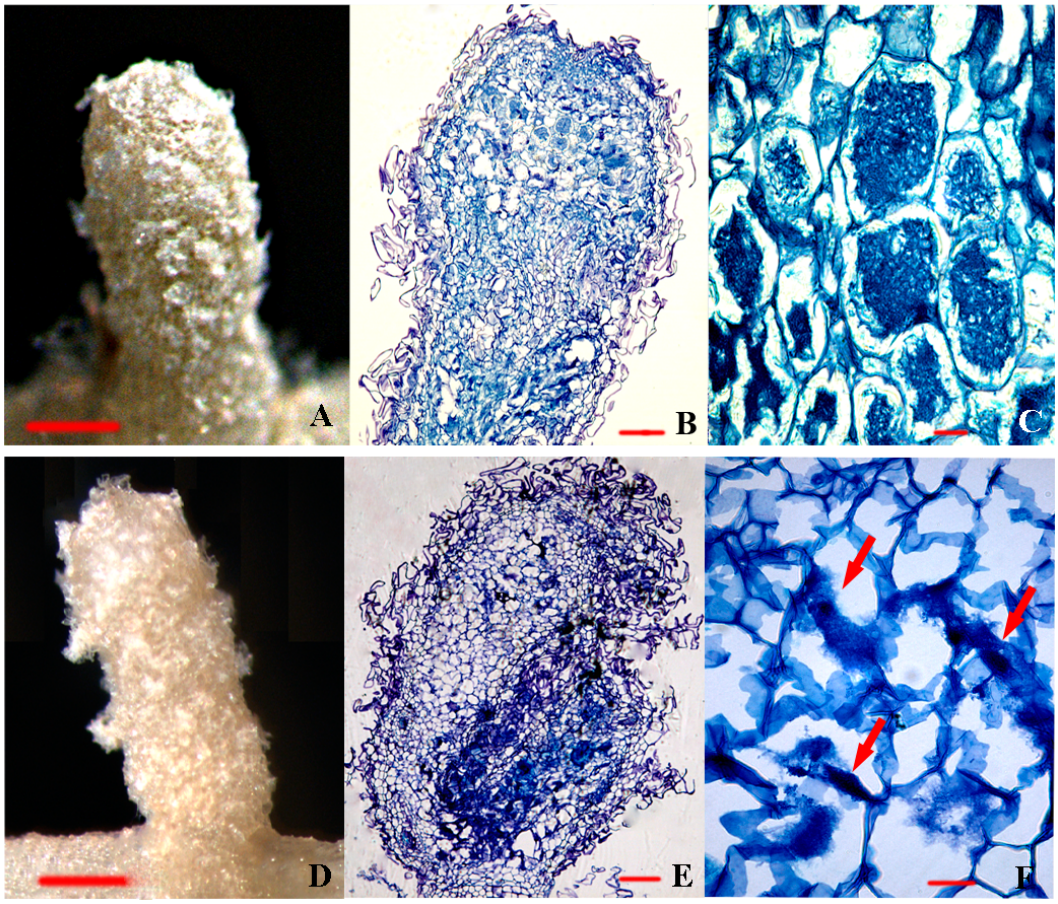


Figura 95. Morfología nodular y cortes histológicos de nódulos de plantas transformadas de *Medicago truncatula* e inoculadas con *E. meliloti* 1021. En nódulos de plantas transformadas con el vector vacío o pKEV, se observa la típica morfología de un nódulo en condiciones normales (A, B) y las células ocupadas por los típicos simbiosomas (C). Los nódulos de plantas transformadas con el plásmido pKcelC tienen similar morfología a los nódulos de plantas sin transformar inoculadas con la cepa 1021C2^{+} (D, E), interior desorganizado y la no formación de simbiosomas típicos (F). Las barras de escala indican 100 µm (A, D), 50 µm (B, E) y 16 µm (C, F).

Se confirma así que existe un menor desarrollo vegetal debido a un contenido en Nitrógeno menor en las plantas transformadas con el gen *celC* e inoculadas respecto de su control transformada con pKEV e igualmente inoculada. Este dato puede ser es debido a un menor número de nódulos eficientes ya que la formación de simbiosomas puede estar es prácticamente nula (debido a la aparición de un fenotipo Bar descontrolado a casusa de la sobreexpresión de celulasa CelC2) en el interior del nódulo de las plantas transformada con el gen *celC* e inoculadas, lo que conlleva una menor fijación de Nitrógeno.

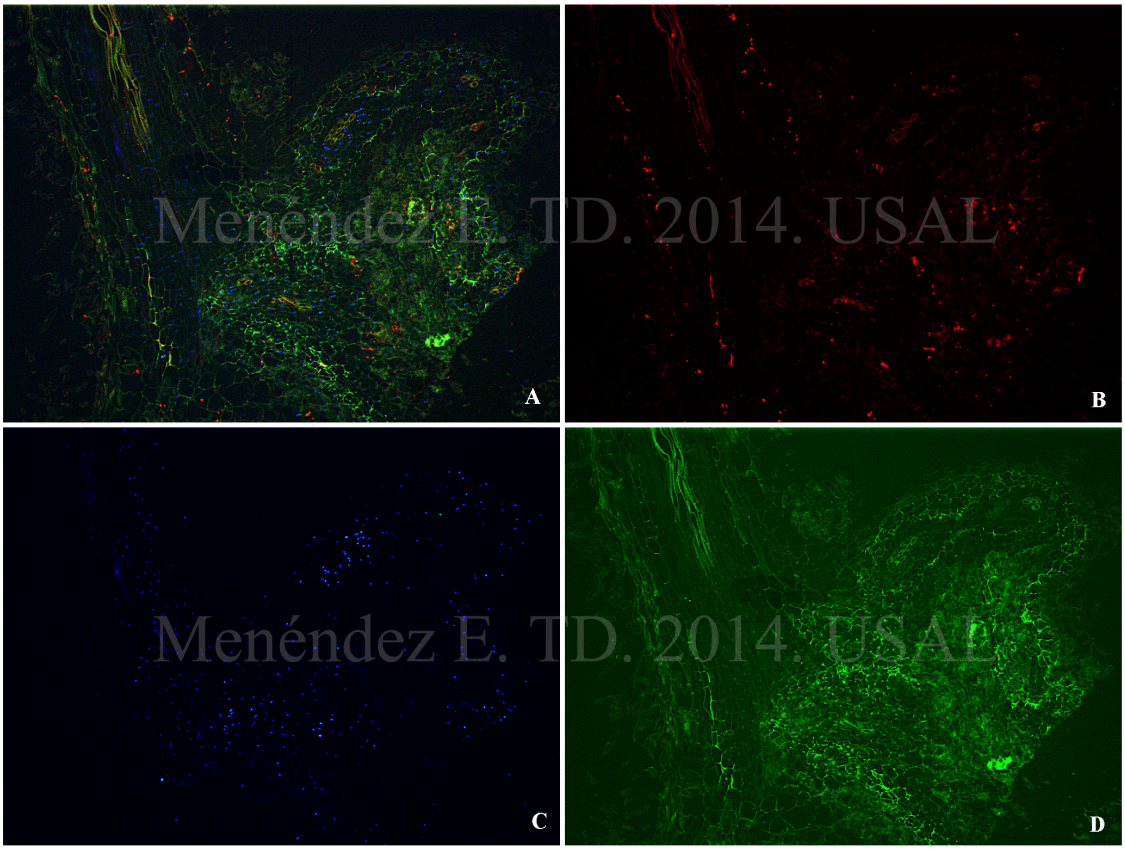
Estos resultados son comparables a los obtenidos inoculando plantas de *Medicago truncatula* sin transformar con la cepa 1021C2^{+}, mutante superproductor de *E. meliloti* 1021, en los que se obtiene un fenotipo similar, tanto en el desarrollo nodular como en el fenotipo simbiótico y crecimiento de la planta (figuras 64 y 73). Este resultado es consistente con los resultados obtenidos anteriormente en *Trifolium repens* cuando es inoculado con mutantes superproductores de *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843 (Robledo *et al.*, 2011).

6. Inmunolocalización de la celulasa CelC2 en el nódulo de raíces transformadas de *Medicago truncatula*.

Mediante la utilización de técnicas inmunohistoquímicas aplicadas a cortes de nódulos de plantas de *M. truncatula* transformadas con el vector pKcelC, que contiene el gen *celC*, se ha conseguido localizar la celulasa CelC2 en las células del nódulo, con el fin de comprobar donde estaba focalizada su acción en la infección secundaria.

Gracias a técnicas de inmunodetección sobre cortes de nódulos de raíces transformadas de *Medicago truncatula* podríamos observar *in situ* dónde puede estar localizada y como actúa la celulasa bacteriana CelC2. Debido al tipo de construcción utilizada, con el gen acoplado a la expresión de una proteína verde fluorescente, a la bacteria elegida (*E. meliloti* 1021 no tiene homólogos al gen *celC* y es capaz de infectar *M. truncatula*) y al diseño de anticuerpos específicos para la celulasa CelC2, pudimos localizar la proteína de interés de una manera ubicua en las paredes celulares de las células de la raíz, (figura 96).

La transformación está confirmada por la expresión de una GFP en la totalidad de la raíz y nódulo (figura 96 D). La tinción con DAPI (figura 96 C), fluoróforo que se une a regiones del DNA ricas en A-T del núcleo de las células vegetales, pone de manifiesto la degradación interna del nódulo debido a que en esta zona no se detectan núcleos pero sí se detectan en el resto del nódulo y raíz observados (figura 96 C). La Celulasa CelC2, que está marcada con el fluoróforo Cy3 (figuras 96 B y 97), que emite en rojo y en naranja, si bien se localiza por toda la raíz y nódulo (figura 98 B), sólo es capaz de hidrolizar las paredes celulares del nódulo en las zonas de infección y/o fijación, coincidiendo con la ausencia de núcleos mostrada por la tinción DAPI (figura 96 C).



Menéndez E. TD. 2014. USAL

Figura 96. Inmunolocalización de la Celulasa CelC2 en raíces de plantas de *M. truncatula* transformadas con el gen *celC* de *Rhizobium* (A). La raíz transformada, que expresa una GFP (D), mantiene intacta su estructura excepto en el interior del nódulo. La tinción DAPI (C) pone de manifiesto una desorganización de la zona interior del nódulo, debido a la ausencia de núcleos. La celulasa CelC2, que está marcada con Cy3 (B) se localiza en todas las células de la raíz transformada incluido el nódulo. Las barras de escala indican 100 µm.

Este hecho es interesante puesto que, si bien se puede detectar la expresión de la celulasa en todo el tejido de la raíz y nódulo, su acción se restringe a las zonas II y III (infección y fijación) del nódulo, produciéndose un fuerte efecto degradativo también observado en los ensayos realizados con plantas no transformadas de *M. truncatula* e inoculadas con la cepa superproductora de la celulasa CelC2.

Con el objeto de determinar la localización subcelular de la celulasa CelC2 expresada *in planta* se procedió a repetir el ensayo inmunohistoquímico en cortes histológicos de nódulos utilizando únicamente el fluorocromo Cy3 (figura 97). Como se puede apreciar en la figura 97 C, esta celulasa se localiza mayoritariamente en las proximidades de la pared celular y/o membrana plasmática. No obstante, la localización subcelular de la celulasa CelC2 deberá confirmarse mediante microscopía electrónica.

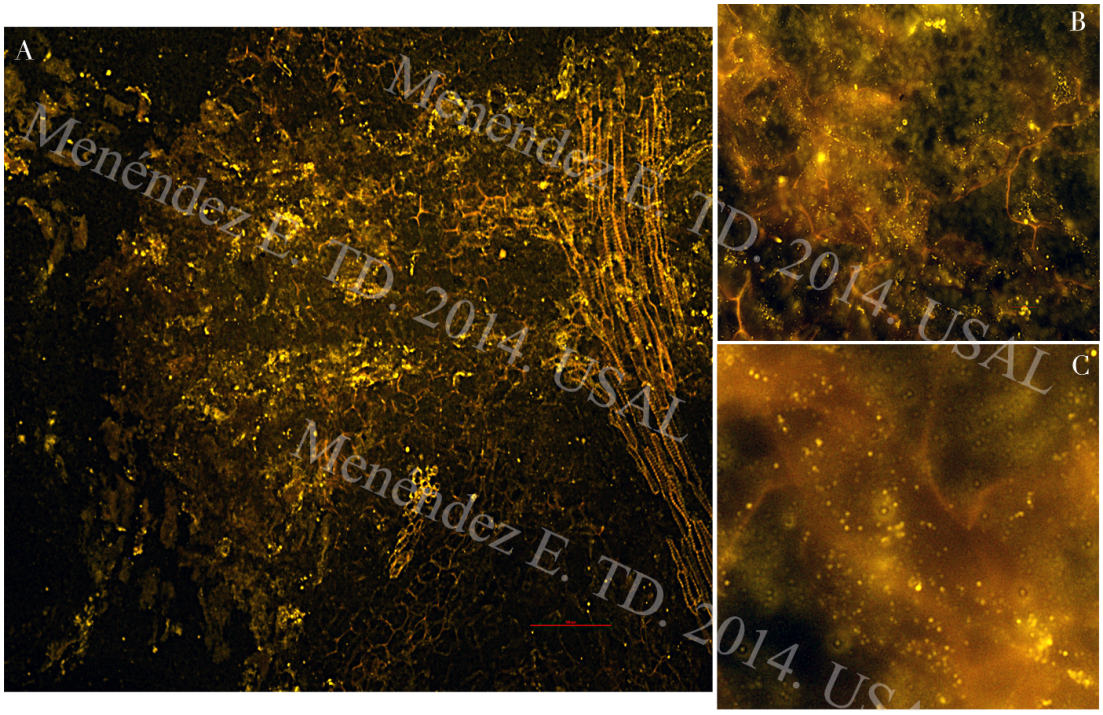


Figura 97 Inmunolocalización de la Celulasa CelC2 en cortes de nódulos de raíz transformada de *Medicago truncatula* e inoculada con *E. meliloti* 1021. Se aprecia que la estructura de la raíz de la planta transformada se mantiene intacta (A) limitando la acción de la celulasa CelC2 a la zona de infección en el interior del nódulo (B). La celulasa se localiza mediante fluorescencia (fluorocromo Cy3) en la pared celular y/o membrana de las células del nódulo (C). Las barras de escala indican 100 µm (A), 25 µm (B) y 16 µm (C).

La celulasa CelC2 no se detectó en cortes de raíces sin transformar tanto inoculadas con *E. meliloti* 1021 como sin inocular. Sin embargo, sí se detectó en cortes de nódulos de plantas sin transformar inoculadas con el mutante superproductor de CelC2, *E. meliloti* 1021C2^{+}. En este caso, también se vio el típico fenotipo producido por la desregulación de celulasa en la zona de infección (figura 98).

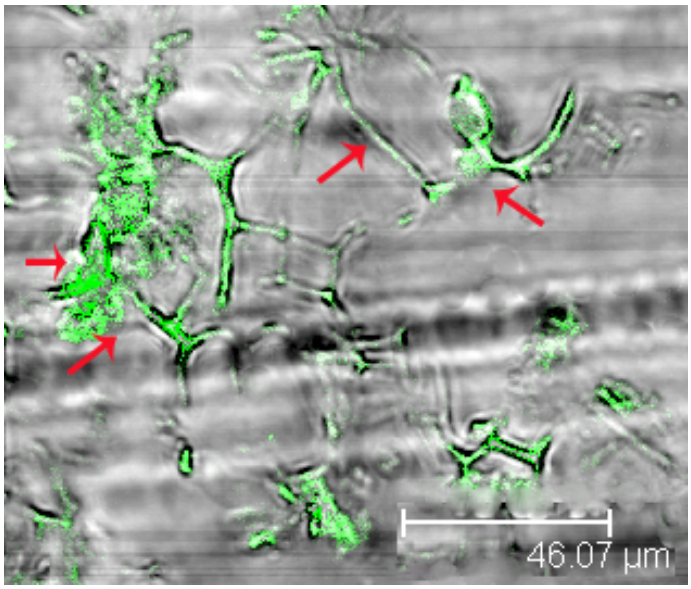


Figura 98. Micrografía de la inmunolocalización de la celulasa CelC2 en un nódulo de *M. truncatula* inoculado con *E. meliloti* 1021C2^{+} tomada mediante microscopía confocal. Las flechas señalan las bacterias que expresan la celulasa CelC2 en espacios intercelulares, además de la observación de canales de infección y la liberación de las bacterias sin diferenciar al interior celular.

Las bacterias que expresan la celulasa CelC2 se localizaron mayoritariamente en los espacios intercelulares en el interior del nódulo. Además, se localizó algún canal de infección con su final degradado, es decir, el fenotipo Bar está alterado en estos nódulos, no diferenciándose las bacterias en bacteroides.

Esta técnica de inmunolocalización nos confirma que esta celulasa está implicada en el proceso de infección secundaria, en el cual las bacterias son liberadas al final del canal de infección (Robledo *et al*., 2011). Los resultados obtenidos muestran cómo a pesar de estar localizada por toda la raíz, la única zona afectada es la zona de infección del nódulo, donde terminan los canales de infección y se liberan las bacterias para convertirse en bacteroides y comenzar la fijación de Nitrógeno.

7. Efecto de la celulasa CelC2 en infección secundaria: transformación de raíces de *Medicago truncatula nip3*.

La celulasa CelC2, como hemos demostrado anteriormente tiene especificidad por la celulosa no cristalina, que además de en el ápice de los pelos radiculares, está localizada al final de los canales de infección.

Debido a esta alta especificidad por celulosa no cristalina y a la desrregulación que supone la sobreexpresión de dicha celulasa tanto en plantas inoculadas con los mutantes superproductores de la CelC2 de

Rhizobium como en plantas transformadas con el gen que la codifica, el hecho de conocer su localización en el nódulo mediante técnicas inmunohistoquímicas nos da una información imprescindible para conocer mejor su función en infección secundaria.

Para comprobarlo, utilizamos mutantes de *Medicago truncatula* afectados en la liberación de las bacterias al final del canal de infección en las celúlas del nódulo. Los mutantes *nip* (Veereshlingam *et al.*, 2004) tienen engrosadas las paredes celulares de los canales de infección y al final de éstos, se forman unos abultamientos que se llenan de bacterias que van llegando a través de los canales. Estas bacterias almacenadas en estos abultamientos no se liberan en la mayoría de las ocasiones (figura 99).

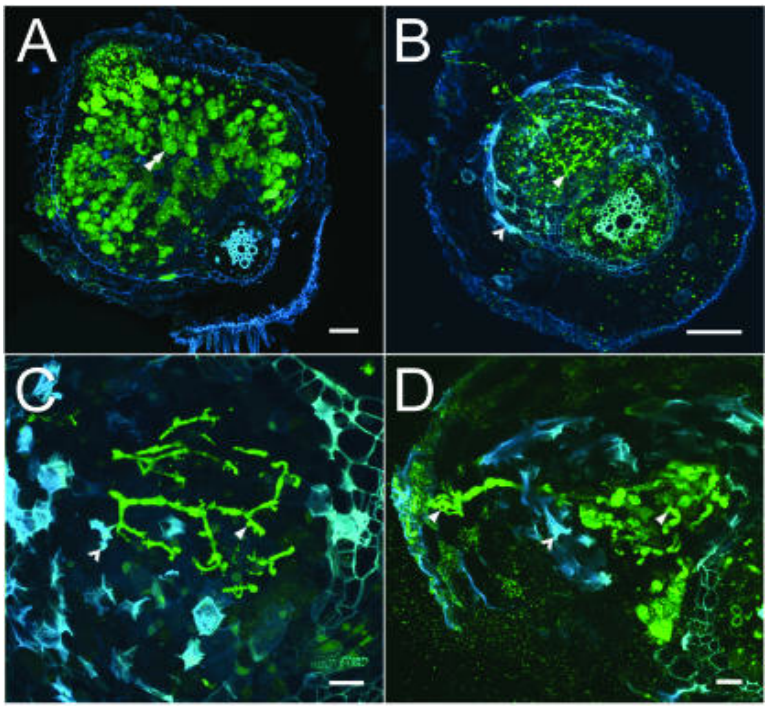


Figura 99. Secciones de nódulos de *Medicago truncatula* A17 (A) y *nip1* (B, C, D) observados mediante microscopía de fluorescencia. Las paredes celulares vegetales se muestran en azul y los lugares donde hay bacterias en verde (fluoróforo SYTO-13). No existe liberación de las bacterias al final del canal de infección en el mutante *nip1* (C). Además, se muestran engrosamientos en el canal de infección (D) (modificada de Veereshlingam *et al.*, 2004). Las barras de escala indican 100 µm (A, B) y 20 µm (C, D).

Los mutantes *nip* poseen alterada la capacidad de liberación de las bacterias al final del canal de infección, es decir tienen alterado el fenotipo Bar (*Bacterial release*), alteración más o menos severa según el alelo afectado, siendo *nip1* el mutante más afectado y *nip3* el menos afectado. Esta alteración es provocada por un engrosamiento de la pared celular del canal de infección, de origen vegetal. Este engrosamiento puede estar producido por una

reacción de defensa a la infección, por ejemplo deposiciones de callosa, cambiando dichas paredes en composición e incluso puede cambiar en composición el final del canal de infección. Esta razón se ve apoyada ya que al inocular *M. truncatula nip3* con el mutante superproductor de celulasa *E. meliloti* 1021C2^{+}, las bacterias seguían sin liberarse probablemente debido a la especificidad de sustrato de dicha celulasa por celulosa no cristalina que en este punto no existe (figura 100).

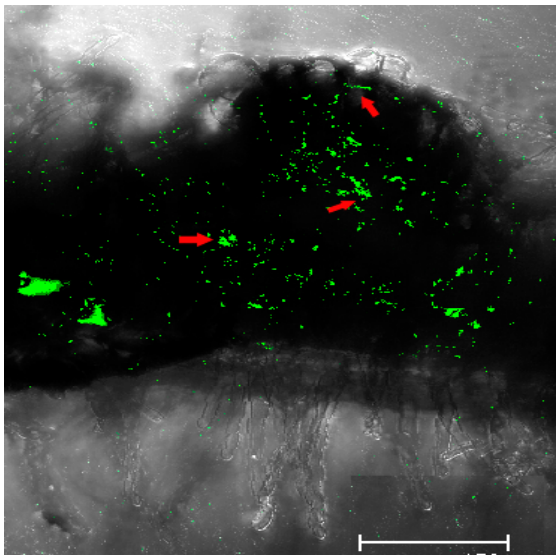


Figura 100 Micrografía de un nódulo de *M. truncatula nip3* inoculado con *E. meliloti* 1021C2^{+} tomada mediante microscopía confocal. Las flechas señalan los canales de infección característicos de este mutante en el interior celular. Las barras de escala representan 150 µm.

Para comprobarlo desde la perspectiva de la planta, decidimos transformar este mutante con el gen *celC* (figura 101) y observamos que tampoco hay liberación, si bien se observan abultamientos de mayor tamaño probablemente debido a la degradación que se produce en otros puntos anteriores del canal de infección, característico de esta celulasa.

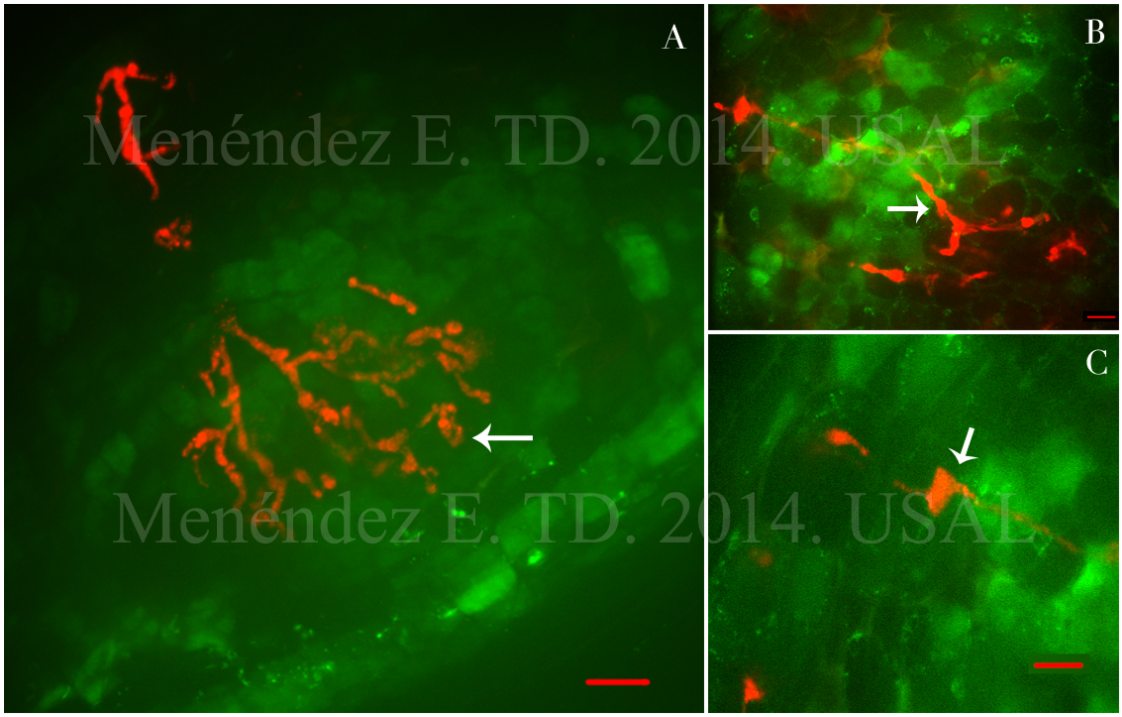


Figura 101. Micrografías de nódulos de plantas de *M. truncatula nip3* transformadas con el vector pKcelC e inoculadas con *E. meliloti* 1021 RFP. No se observa fenotipo Bar al final de los canales de infección (A, C) los cuales son visiblemente más gruesos de lo normal (B). Las barras de escala representan 50 µm (A), 25 µm (B) y 16 µm (C).

Con estos últimos ensayos, observamos que el fenotipo Bar no revierte ni desde el interior (1021C2^{+}) ni desde el exterior (pKcelC) del canal de infección. Este resultado nos indica que probablemente cambie la composición de la pared celular del canal de infección, posiblemente a un material que no es capaz de hidrolizar dicha celulasa CelC2, como por ejemplo la callosa.

La especificidad de esta celulasa en la infección primaria de la simbiosis *Rhizobium – Trifolium*, en la que se produce una clara erosión en el ápice del pelo, denominado fenotipo Hot, no ocurre en el sistema *Medicago - Ensifer*, en el cual no hay evidencias de este fenotipo, pero sí existe un efecto degradativo en la infección secundaria, es decir, una degradación en el final del canal de infección. Como consecuencia, se impide la diferenciación en bacteroides para formar los típicos simbiosomas, con lo cual, la fijación de Nitrógeno se ve claramente disminuida. Todos estos resultados sugieren la existencia de una especificidad en la infección primaria que no ocurre en la infección secundaria.

8. Influencia de la celulasa CelC2 en la biosíntesis de celulosa vegetal.

Finalmente, decidimos realizar una aproximación a la posible influencia que tiene esta celulasa bacteriana en la biosíntesis de celulosa vegetal. Para ello se procedió al cultivo de las plantas transformadas sin inocular en presencia de Nitrógeno. Tanto la transformación como el cultivo se realizaron de igual manera que en las plantas transformadas e inoculadas en ausencia de Nitrógeno, con la salvedad de que a la solución de riego semanal se le añadió NH_4NO_3 a una concentración final de 5 mM. De las plantas transformadas con ambos vectores, se seleccionaron las plantas que poseían raíces fluorescentes (figura 102 C), ya que este color es indicativo de una transformación eficaz, escindiendo en algún caso las posibles raíces quiméricas. Estas plantas se trasvasaron a las macetas estableciéndose un período de aclimatación de una semana aproximadamente. Una vez transcurrido este tiempo se cultivaron otras 11 semanas con un riego semanal de Fähraeus suplementado con Nitrógeno.

Aparentemente, cumplido el tiempo de cultivo y a la hora de la recogida de datos, el desarrollo vegetal de las plantas transformadas con pKEV y pKcelC después de 3 meses de cultivo en invernadero en presencia de Nitrógeno es similar entre ellas (figura 102).

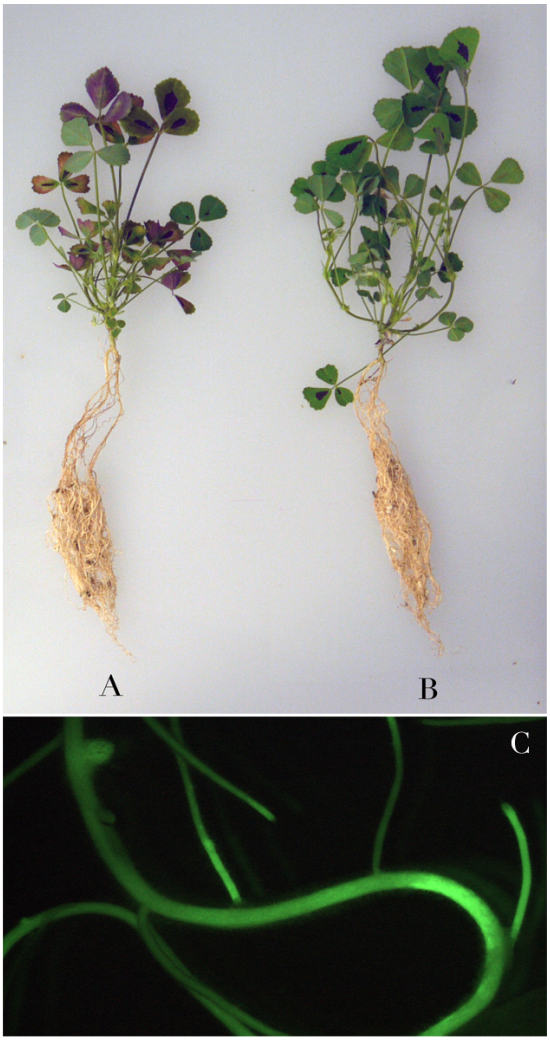


Figura 102 Fenotipo mostrado por las plantas de *Medicago truncatula* transformadas: A) transformadas con el vector vacío pKEV sin inocular, B) transformadas con el vector pKcelC sin inocular. Estas plantas se cultivaron en presencia de Nitrógeno (NH_4NO_3 5mM) durante 90 días, en condiciones controladas de invernadero. Las raíces transformadas se comprobaron mediante microscopía de fluorescencia, ya que expresan una GFP (C).

La medición de la longitud de la parte aérea nos reveló que no existían diferencias significativas entre las plantas transformadas con pKEV y pKcelC (figura 103 A).

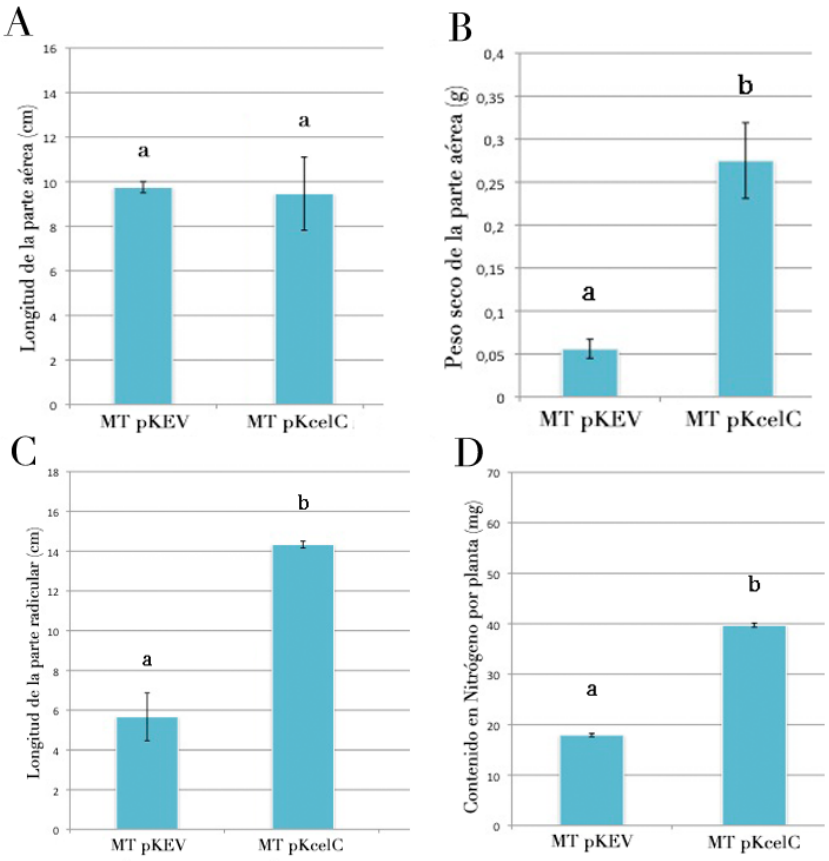


Figura 103 Longitud de la parte aérea (A), peso seco de la parte aérea (B), longitud de la parte radicular (C) y contenido en Nitrógeno por planta (D) de plantas de *Medicago truncatula* con raíces transformadas y cultivadas en presencia de Nitrógeno. La gráfica representa los valores medios representativos de un ensayo de al menos 12 plantas por tratamiento. Las barras de error representan el error estándar. Las barras coronadas con letras diferentes representan valores estadísticamente significativos (Fisher's PLSD $p \leq 0{,}05$).

Si bien, donde sí podemos observar diferencias significativas es en la longitud de la parte radicular (figura 103 C), en la que las raíces de plantas transformadas con el vector vacío pKEV (control), presentan una longitud significativamente menor que en el caso de las plantas transformadas con el vector con el gen de interés.

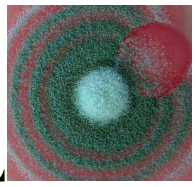
También se observaron diferencias significativas en el peso seco de la parte aérea de las plantas (figura 103 B), donde el peso seco de la parte aérea de las plantas control es significativamente menor que el de las plantas transformadas con pKcelC.

En cuanto a la medida del Nitrógeno total por planta (figura 103 D) realizado en este ensayo, podemos observar que también existen diferencias significativas entre las plantas transformadas con pKEV y las plantas transformadas con pKcelC. Al igual que ocurre con los parámetros anteriores,

el contenido en Nitrógeno es superior en estas plantas transformadas con pKcelC.

Las plantas transformadas con el vector pKcelC son las que presentan un mayor desarrollo tanto en la parte aérea como en la raíz lo que conlleva a una mejor asimilación del Nitrógeno presente en la rizosfera. Estos datos podrían indicar que este enzima pudiera estar implicado en el desarrollo vegetal, debido probablemente a su implicación en la biosíntesis de celulosa vegetal. Según lo descrito en la literatura, mutantes de *Arabidopsis thaliana* defectivos en KORRIGAN (Nicol *et al.,* 1998; Zuo *et al*., 2000; Sato *et al.,* 2001; Molhoj *et al*., 2001) provocan cambios en la estructura de la celulosa de la planta, induciendo enanismo. Por otro lado, plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobrexpresan la endoglucanasa KOR-*like* PaPopCel1 de *Populus* presentan un incremento en el desarrollo de todos los órganos analizados (Park *et al*., 2003), al igual que plantas transgénicas de *Populus tremula* que sobreexpresan la celulasa Cel1 de *Populus* presentan elongados sus internodos y sus células suberosas (Shani *et al*., 1999). Más recientemente también se ha demostrado como plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobrexpresan PttCel9A1, ortólogo de las endoglucanasas KORRIGAN de *Populus* provocan un incremento en la elongación de las células vegetales, inducido por una pérdida de cristalinidad de las paredes celulares (Takahashi *et al.,* 2009). Si bien nuestros resultados concuerdan con los descritos en la literatura, ya que tanto el desarrollo vegetal es mayor en las plantas transformadas con el gen *celC* respecto de las que están transformadas con el vector pKEV, sería necesario realizar una transformación estable para confirmar la implicación de esta celulasa bacteriana en la biosíntesis de celulosa vegetal.

DISCUSIÓN GENERAL



El aumento exponencial de la población mundial en las últimas décadas debido sobretodo al crecimiento demográfico en los países no desarrollados es un motivo que debe ser de preocupación mundial ya que, las continuas hambrunas y la desnutrición, sobre todo infantil, se están extendiendo de una forma alarmante. En este escenario global, la producción agrícola, que aumentó con la llegada de las nuevas mejoras en agricultura acontecidas en el siglo pasado, no es suficiente ya que, si bien la superficie de tierra de uso agrícola se ha mantenido estable en las últimas dos décadas, la proporción de tierras cultivables ha disminuido casi al 50%, según datos de la FAO en 2013.

Los fertilizantes químicos, artífices en su mayor parte del aumento en la productividad agrícola, han provocado problemas medioambientales y en la salud pública, cambiando los ciclos biogeoquímicos naturales, como por ejemplo el ciclo del nitrógeno y el ciclo del fósforo, y afectando negativamente a la salud humana y animal, a la biodiverdidad y generando eutrofización de aguas (Cowling *et al.,* 2001; Erisman *et al.,* 2011).

Una de las alternativas que se proponen al abuso de fertilizantes químicos es la utilización de biofertilizantes basados en microorganismos beneficiosos. El uso de fertilizantes microbianos está apoyado por directivas europeas, nacionales y regionales, que promueven la reducción de fertilizantes nitrogenados y el aumento del uso de fertilizantes orgánicos para así favorecer la agricultura sostenible y disminuir la liberación de gases nocivos hacia la atmósfera, reduciendo el efecto invernadero y demás eventos negativos para la salud y el medio ambiente.

Los microorganismos que establecen interacciones mutualistas con plantas contribuyen a la superviviencia de dichas plantas ya que, son cruciales en la asimilación de nutrientes, confieren resistencia contra patógenos y ante estreses ambientales, mejoran el desarrollo vegetal y además, los microorganismos diazotrofos contribuyen a la fijación del Nitrógeno atmosférico que las plantas no son capaces de fijar por sí solas. Los beneficios de estas asociaciones simbióticas son conocidos y muy estudiados en la comunidad científica, que tiene por objetivo y principal reto la investigación y optimización de las relaciones simbióticas, buscando una mayor adecuación al medio ambiente y un mejor desarrollo de biofertilizantes multifuncionales.

De entre estos microorganismos, el género *Rhizobium* y su interacción con leguminosas ha sido la interacción más estudiada por excelencia, aunque en los últimos años se ha propuesto su utilización como inoculante promotor del crecimiento vegetal en otros cultivos, como cereales y hortícolas (Yanni *et al*., 2001; Flores-Félix *et al*., 2013). El establecimiento de una simbiosis rhizobia-leguminosa eficiente requiere de un proceso de infección o entrada del rizobio en la planta leguminosa, proceso complejo y extremadamente regulado, seguido de la formación de nódulos para que pueda ocurrir la fijación de Nitrógeno (Oldroyd *et al.,* 2011). El establecimiento de esta

simbiosis eficiente y las etapas de desarrollo posteriores dependen del tipo de hospedador, ya que tanto planta como bacteria deben ser compatibles.

En nuestro grupo de investigación se ha demostrado que *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii ANU843 produce una celulasa, denominada CelC2, que es esencial en la infección primaria en su planta hospedadora *Trifolium repens* (Robledo *et al*., 2008) y que este paso debe estar estrictamente regulado (Robledo *et al*., 2011a). Además, para la celulasa CelC2, se predice otro rol importante en la biosíntesis de celulosa, ya que mutantes alterados ya sean defectivos o superproductores de celulasa CelC2 muestran diferentes comportamientos en la biosíntesis de celulosa, formación de biofilms y colonización de superficies tanto bióticas como abióticas (Robledo *et al.*, 2012). Además, la expresión de dicha celulasa en otras cepas de *Rhizobium leguminosarum* como la cepa E11, con características PGPR en arroz (Yanni *et al*., 2001), ha demostrado un efecto similar en colonización de superficies y en la infección tanto de su leguminosa homóloga como del arroz (Rivera TD, 2013).

La celulasa CelC2 posee homólogos en varios géneros de la familia Rhizobiaceae, como por ejemplo en el género *Ensifer*, donde se han encontrado especies cuyos genomas contienen genes *celC* con una similitud de hasta un 70% en secuencia con el gen *celC* de *Rhizobium*, como ocurre en *E. medicae* WSM419, endosimbionte de especies de leguminosas del género *Medicago*. La implicación de la celulasa CelC2 en *Trifolium repens* ha sido probada en nuestro laboratorio mostrando los efectos antes descritos, pero, debido a que, ni la cepa rizobiana ni la planta hospedadora son organismos modelo de estudio de las interacciones simbióticas, la profundización en las funciones de dicha celulasa a otros niveles está muy limitada. Además, poco es conocido sobre la acción de celulasas en otras interacciones simbióticas, como por ejemplo la interacción modelo *Ensifer – Medicago*.

En esta memoria de tesis doctoral, se utilizaron principalmente organismos modelo para los cuales existen multitud de recursos y herramientas adecuadas para el estudio a nivel molecular de la implicación de la celulasa CelC2 de *Rhizobium* y la celulasa CelC de *Ensifer* en la colonización, infección primaria, infección secundaria, desarrollo nodular y desarrollo vegetal, tanto expresada en las bacterias como expresada *in planta*. Además se utilizaron técnicas de microscopía, inmunológicas, bioquímicas, genéticas y de biología molecular para la observación y caracterización de todos los eventos relacionados con ambas celulasas.

Estudios previos muestran que el gen *celC* esta localizado en un operón implicado en la biosíntesis de celulosa bacteriana, denominado operón *celABC* o *bscABZ*, que está presente en numerosos géneros bacterianos como en *Escherichia* o *Klebsiella*, además de haberse identificado en numerosas cepas de *Rhizobium leguminosarum* y en otras especies del género como *R. etli* o *R. tropici*, aunque en algunas cepas, este operón posee un gen adicional como en

el caso de *R. leguminosarum* bv trifolii 3841 y *Agrobacterium tumefaciens*, reclasificado como *Rhizobium radiobacter* (Robledo *et al*., 2011; Mathysse *et al*., 1995; Young *et al.*, 2011). En los análisis *in silico* realizados en el capítulo primero de esta memoria, se encontraron similitudes en un alto porcentaje entre los 3 genes que conforman el operón en varias especies de *Ensifer*, *Burkholderia*, *Azospirillum* y *Methylobacterium*, además de las encontradas en trabajos anteriores del grupo.

Se encontró una alta similitud de secuencia nucleotídica de este operón en *Ensifer medicae* WSM419, *E. fredii* HH103, *E. fredii* NGR234, *E. fredii* USDA257, *E. adhaerens* OV14 y *E. meliloti* GR4, de entre un 91 a un 74% en el gen *celA*, entre un 68 y un 70% en el gen *celC* y una similitud variable en el gen *celB*, lo que sugiere que la función de este gen, no muy bien estudiada hasta el momento es importante para la biosíntesis de celulosa debido a su elevada variabilidad de secuencia. A diferencia de *Rhizobium*, el operón *celABC* en *Ensifer* se localiza en plásmidos, con la excepción de *E. fredii* USDA257 y *E. adhaerens* OV14, cuyo operón se localiza en el cromosoma. A nivel de proteína, se encontraron altas similitudes de secuencia aminoacídica entre ellas y los dominios proteicos (GTL_2/PilZ en CelA, BcsB en CelB y GH8 en CelC) coincidentes en todos los operones *celABC* analizados.

También se localizaron otros genes implicados en la biosíntesis de celulosa, como el operón denominado *celIJK* en distintas cepas de *E. meliloti*, como son 1021, AK83, SM11 y BL225C, además de en *E. medicae* WSM419, que posee los dos operones, aunque en este caso su localización es cromosómica, como lo es en las distintas cepas de *E. meliloti*, excepto en 1021 y AK83 cuya localización es plasmídica.

Las altas similitudes del operón *celABC* encontradas en las especies del género *Ensifer* con el operón *celABC* de *Rhizobium* pero la distinta localización del operón en la mayoría de los casos sugiere que ha habido transferencia horizontal de genes entre especies en algún punto de la evolución aunque, la capacidad de producción de celulosa y otros exopolisacáridos no parece haber sido adquirida en el momento de la transferencia de este operón. Esta hipótesis se apoya en la existencia de otros operones implicados en producción de celulosa de localización cromosómica en otros miembros de *Ensifer*, como es el operón *celIJK*. La cepa WSM419 de *E. medicae* contiene ambos operones funcionales, no en vano es la mejor productora de celulosa del género *Ensifer* (+++) respecto a otras cepas, como muestra la intensa coloración rojiza de las colonias cuando se cultiva en medio suplementado con Rojo Congo.

El hecho de que esta cepa mostrase una mayor producción de celulosa y una buena formación de biofilms *in vitro* (capítulo 2) sugiere que dicha cepa es una excelente colonizadora de superficies radiculares, como en efecto ocurre en la colonización de raíces de las plantas utilizadas para este estudio, formando estructuras tridimensionales típicas de un biofilm. Este hecho no

ocurre en los ensayos con la cepa 1021, la cual, aún siendo defectiva en producción de exopolisacárido EPSI (Glazebrook and Walker, 1989), puede colonizar y establecer simbiosis con alfalfa, su planta hospedadora, gracias al EPSII (González *et al*., 1996). En los ensayos realizados la cepa 1021 tuvo peores resultados en formación de biofilms, producción de celulosa (-) y colonización que *E. medicae* WSM419 probablemente debido a que el operón *celIJK* no participa de igual manera que el operón *celABC* en colonización.

Como hemos apuntado anteriormente, los estudios previos de nuestro grupo en *R. leguminosarum* demostraron la implicación de la celulasa CelC2 en la biosíntesis de celulosa y la colonización de superficies en trébol. Algunos resultados preeliminares obtenidos en nuestro grupo de investigación apuntaron a la existencia de una regulación propia del gen *celC,* además de la propia regulación del operón. Esta hipótesis se propuso basándose en la predicción de secuencias promotoras o reguladoras contenidas en la secuencia del gen *celB.* La importancia del gen *celB* en la biosíntesis de celulosa fué probada en los resultados de Ausmees y colaboradores, en los que la producción de celulosa se veía alterada por la mutación por inserción en este gen de *Rhizobium leguminosarum* (Ausmees *et al*., 1999). Además, muy recientemente se ha propuesto la función de la proteína CelB como proteína estructural de membrana, formando parte del complejo celulosa sintasa (Morgan *et al*., 2013), aunque estos estudios basados en cristalografía de proteínas deben ser comprobados mediante otras aproximaciones. En este trabajo, se comprobaron las predicciones bioinformáticas realizadas anteriormente y se diseñó una fusión transcripcional con la parte del gen *celB* para la que se predijo la secuencia reguladora acoplada a una GFP sin promotor. Los resultados obtenidos indicaron que la secuencia clonada contenía dicha secuencia reguladora, ya que en contacto con la planta, la proteína GFP se expresaba en los lugares donde se expresa la celulasa CelC2, es decir en el punto de entrada del rizobio en el pelo radicular y a lo largo del canal de infección. Se siguió expresando hasta el final del canal de infección, coincidente con la zona II o zona de infección del nódulo. No se observó fluorescencia en las zonas de fijación ni de senescencia del nódulo, indicando que el gen *celC* deja de expresarse cuando el rizobio se diferencia en bacteroide. Tampoco se observó fluorescencia en cultivo puro por lo que el promotor/ regulador es inducible en contacto con la planta.

La aparición de fluorescencia confirma que la secuencia clonada como posible promotor y/o secuencia reguladora interior es tal, apoyando la idea de una posible regulación propia de *celC*, independientemente de la regulación del operón entero. Sin embargo, en un futuro es necesario profundizar en el conocimiento de esta regulación interna, mediante la acotación de la secuencia clonada, determinándose con exactitud la secuencia reguladora. Debido a estos resultados, el gen *celB* cobra una importancia máxima en todos los aspectos de la interacción con plantas y biosíntesis de celulosa, por lo que serán necesarios posteriores estudios que determinen su función específica.

La importancia de conocer los mecanismos reguladores de la expresión del gen *celC* de *Rhizobium* queda comprobada en los resultados mostrados pero poco es conocido sobre los efectos de esta celulasa ni de otras celulasas en otros sistemas simbióticos por lo que se obtuvieron mutantes CelC2$^+$ en *E. meliloti* 1021 y *E. medicae* WSM419 y mutantes CelC$^+$ en *E. medicae* WSM419. La caracterización bioquímica de los mutantes obtenidos se realizó de acuerdo con los métodos utilizados para la caracterización de la cepa ANU843C2$^+$ (Robledo *et al.*, 2011). Estos métodos también se utilizaron para la caracterización de la celulasa CelC de *Ensifer* y los resultados muestran que se trata de una proteína similar a la CelC2 aunque la banda encontrada en la electroforesis SDS_PAGE nos sugiere una proteína con una masa molecular ligeramente superior. Además la cuantificación mediante BCA, mostró una actividad enzimática ligeramente superior a la actividad de la cepa ANU843C2$^+$, aunque 3 veces superior a la actividad de la cepa silvestre. Por ello, en un futuro es imprescindible la completa caracterización de esta celulasa CelC.

Seguidamente, se estudiaron las implicaciones de la celulasa CelC2 en producción de celulosa y formación de biofilms *in vitro*. La cepa 1021 no presentaba coloración rojiza, sino blanquecina, signo de la pobre producción de exopolisacárido característica y presentaba una pobre formación de biofilms, concordando este dato con los publicados por Fujishige y colaboradores (Fujishige *et al*., 2006). La cepa 1021C2$^+$ no mostró diferencias en coloración ni textura con 1021 y la formación de biofilms fué ligeramente inferior. En este caso, la expresión heteróloga de la celulasa CelC2 parece no tener ningún efecto o si lo tuviese, queda enmascarado por la deficiencia en formación de exopolisacárido característico de esta cepa.

En este punto comezamos a monitorizar y analizar las implicaciones de este enzima en todas las etapas del proceso simbiótico: colonización de la superficie radicular, infección primaria, infección secundaria y desarrollo nodular, todo ello *in planta*. Además, se evaluaron los fenotipos simbióticos obtenidos en *Medicago truncatula* y se analizaron diversos parámetros relacionados con el desarrollo vegetal. Para un mejor seguimiento de los fenotipos observados se adjunta a continuación una tabla en la que se resumen los resultados obtenidos para cada una de las combinaciones planta rizobio (tabla 36).

Tabla 36. Resumen de los fenotipos observados en las diferentes combinaciones planta rizobio utilizadas durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

Combinaciones realizadas		Colonización		Infección primaria				Infección secundaria			Desarrollo vegetal	
		Superficie radicular	Pelos radiculares	noi	Had + Hac	HoT	RaT	Número total nódulos	Efectivos	Presencia simbiosomas	Masa parte aérea	N_2
Trifolium repens (trébol)	Control	-	-	-	-	=	=	-	-	-	=	=
	*Rlt*ANU843	+	+	+	↑	↑	↑	16**	+	+	↑**	↑**
	*Rlt*ANU843C2$^+$	+	-	+	↓	↑↑	↑↑	13**	-	-	↓**	↓**
	*Em*1021	+	+/-	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-
	*Em*1021C2$^+$	+	-	-	-	↑↑	↑↑	-	-	-	-	-
	*Em*WSM419	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	*Em*WSM419C2$^+$	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	*Em*WSM419EMC$^+$	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Medicago sativa (alfalfa)	Control	-	-	-	-	=	=	-	-	-	=	=
	*Rlt*ANU843	+	+/-	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-
	*Rlt*ANU843C2$^+$	+	-	-*	-	↓	↑↑	-	-	-	-	-
	*Em*1021	+	+	+	↑	↑	=	9**	+	++	↑**	↑**
	*Em*1021C2$^+$	+	-	+	↑	↓	↑↑	7**	-	-	↓**	↓**
	*Em*WSM419	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	*Em*WSM419C2$^+$	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	*Em*WSM419EMC$^+$	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Medicago truncatula	Control	-	-	-	-	=	=	-	-	-	=	=
	*Rlt*ANU843	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	*Rlt*ANU843C2$^+$	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	*Em*1021	+	+	+	↑	↑	↑	15	+	+	↑	↑
	*Em*1021C2$^+$	+	-	+	↓	↑	↑↑	14	-	-	↓	↓
	*Em*WSM419	+	+	+	nd	nd	nd	34	++	+++	↑↑	↑↑
	*Em*WSM419C2$^+$	+	-	+	nd	nd	nd	19	-	-	↓	↓
	*Em*WSM419EMC$^+$	+	nd	+	nd	nd	nd	26	+/-	+/-	↑	↑

*Nódulos raramente observados. **Datos tomados de Robledo TD, 2010. Clave: nd, no determinado; ↑ incremento; ↓ descenso; +, presencia; - ausencia

Los ensayos de colonización de superficies radiculares *in planta* mostraron un comportamiento similar en ambas cepas. La diferencia en el comportamiento de las cepas 1021 y 1021C2^{+} *in vitro* respecto a *in planta* da peso a la hipótesis de que existe un inductor de la colonización de estas cepas en presencia de la planta. Este posible inductor se muestra independiente de la expresión heteróloga de la celulasa CelC2 ya que, no observamos diferencias en la manera de colonizar la superficie radicular de plantas tanto homólogas como heterólogas entre ambas cepas. El comportamiento en colonización en pelos radiculares no fué similar en el caso de la formación de caps en el ápice de los pelos radiculares ya que, si bien, la cepa silvestre los forma, la cepa transformada no formaba caps, sino que colonizaba toda la superficie del pelo de una manera uniforme y/o las bases del pelo radicular. Este fenotipo ya fué observado por Robledo y colaboradores en la cepa ANU843C2^{+}, por lo que podemos decir que se produjo a causa de la expresión heteróloga de dicho enzima (Robledo *et al*., 2012). Cabe destacar que tanto la cepa 1021 como 1021C2^{+}, colonizan la superficie celular de la raíz de igual manera tanto en *M. sativa* como en *T. repens* y *M. truncatula*, por lo que podemos decir que actúa como endófito, demostrando así que la colonización y adhesión bacteriana a superficies radiculares es independiente de la infección. El comportamiento de los rizobios como endófitos y PGPRs ha sido ampliante estudiado en multitud de cultivos (Chabot *et al*., 1996; Yanni *et al.*, 2001; García-Fraile *et a*l., 2012; Flores-Félix *et al.*, 2013), demostrándose así la independencia de los procesos de colonización respecto de las infecciones inter/intracelulares llevadas a cabo por dicha bacteria en leguminosas.

La cepa WSM419 presentaba una coloración óptima en los ensayos de producción de celulosa y una buena formación de biofilms, además de que la colonización en su planta homóloga, *M. truncatula*, se realiza formando las típicas estructuras tridimensionales de los biofilms microbianos. Por otro lado, en la colonización *in planta* llevada a cabo por la cepa WSM419C2^{+} no se observaron diferencias sustanciales respecto a la cepa WSM419, colonizando ambas de similar manera, formándose estructuras tridimensionales típicas propias de la formación de biofilms. Además, la menor formación de biofilms observada, estadísticamente no significativa, en la cepa WSM419C2^{+} no parece ser debida a la expresión heteróloga de la celulasa CelC2 en esta cepa puesto que, por un lado, el crecimiento de ambas cepas puede diferir ligeramente, ya que la cepa WSM419C2^{+} debe replicar el plásmido extra añadido mientras que la cepa silvestre no, lo que explicaría la ligera disminución en la formación de biofilms. Por otro lado, las colonias observadas en el ensayo de producción de celulosa no presentan un color diferente del presentado por la cepa silvestre. El comportamiento de la cepa WSM419, decreciente en formación de biofilms, sucede debido a que ha sobrepasado la fase estacionaria, donde se producen las microfibrillas de celulosa, por lo que el biofilm puede comenzar su desintegración.

Los datos obtenidos sugieren que la expresión heteróloga de la celulasa rizobiana CelC2 en las distintas bacterias ensayadas del género *Ensifer* no afecta a la biosíntesis de celulosa en dicho género, por lo que podemos decir que dicha celulasa es específica en biosíntesis de celulosa bacteriana.

A continuación, decidimos realizar un análisis de los eventos que ocurren en la infección primaria, que sigue a la colonización y adhesión del rizobio al pelo radicular. La celulasa CelC2 ha sido descrita como esencial en infección primaria (Robledo *et al.,* 2008), puesto que degrada específicamente y de una forma muy localizada la pared celular del extremo apical del pelo radicular de su planta hospedadora, el trébol blanco. La pared celular en ese punto de crecimiento apical de los pelos radiculares se compone de celulosa no cristalina, la cual es sustrato específico de dicho enzima (Mateos *et al.,* 1992; Mateos *et al*., 2001; Robledo *et al*., 2008). La celulasa CelC2 purificada es capaz de producir este fenotipo, denominado fenotipo HoT en trébol, sin embargo no fué capaz de degradar la pared celular de alfalfa (*Medicago sativa*), por lo que en este trabajo se propuso confirmar la especificidad de hospedador mostrada por dicho enzima. Los ensayos de infección con las cepas 1021 y 1021C2^{+} realizados en *Trifolium* y *Medicago* confirmaron los resultados obtenidos anteriormente. Si bien existe un aumento no significativo en el número de HoT en la inoculación de *Medicago sativa* con las cepas 1021 y ANU843 y sus derivados C2^{+} respecto a los controles sin inocular, este incremento no es debido a la acción de la celulasa CelC2 en ambos casos, ya que el número de HoT es ligeramente inferior en las cepas transformadas respecto a las cepas silvestres. Dazzo y colaboradores observaron que en presencia de un rizobio, sea o no sea compatible, la pared celular del pelo radicular se debilita e incluso se podría llegar a romper, encontrándose zonas compuestas de celulosa no cristalina y otras zonas de celulosa cristalina, todo ello observado mediante microscopía de luz polarizada (Dazzo *et al*., 1996). Este hallazgo explica el fenotipo que nosotros encontramos en estos ensayos, poniendo de manifiesto que la planta es capaz de percibir la bacteria e inducir cambios en la estructura de la pared celular. Además, mutantes deficientes en la producción de factores de nodulación, también inducen los cambios estructurales en la composición de la pared celular (Dazzo *et al*., 1996).

Estos cambios son independientes de que se establezca o no spiking de calcio puesto de los cambios conformacionales en la pared celular ocurren en el crecimiento normal de los pelos radiculares, si bien, en presencia de factores de nodulación de rizobios, sean o no sean compatibles también ocurren. Ardourel y colaboradores propusieron la existencia de dos tipos de receptores de factores de nodulación, uno que prepara a la planta para la infección promoviendo el crecimiento del ápice del pelo radicular y división celular en el córtex y otro más específico de la estructura de los factores de nodulación, cuyas sustituciones en su esqueleto determinan la especificidad de hospedador (Ardourel *et al*., 1994). Además, factores de nodulación con diferentes sustituciones pueden iniciar despolarizaciones de membrana, como

ocurre en *M. sativa* (Felle *et al*., 1995; Kurkdjian *et al*., 1995). Estudios más recientes muestran que NFP es el receptor citado en primer lugar y LYK3 es el segundo, es decir, el que controla la entrada del rizobio en el canal (Smit *et al*., 2007).

Algunos estudios previos proponen la participación de enzimas hidrolíticos de la planta que inducen el abultamiento que sufren los pelos antes del crecimiento apical inducidas por la participación de los factores de nodulación. Los abultamientos se suceden con el crecimiento polar de los pelos que además es precedida por una hidrólisis local de la pared celular (Cocking, 1985; Dazzo *et al*., 1987; Heidstra *et al.*, 1994). Nuestros resultados muestran una elevada formación de redirecciones polares en los pelos radiculares en las raíces de plantas inoculadas con las cepas que sobreexpresan la celulasa CelC2 respecto de las inoculadas con las cepas silvestres y sus respectivos controles sin inocular. Este fenotipo, denominado RaT (*Redirections at the Tip*), es independiente a los efectos de los factores de nodulación, puesto que este incremento significativo en el número de RaT sucede en todas las plantas analizadas (trébol, alfalfa y *M. truncatula*) y en el mutante *nfp1* de *M. truncatula*, que tiene interrumpida la ruta de señalización molecular en los primeros niveles (Ben Amor *et al.*, 2003). Este fenotipo, aunque similar, no es debido a la adición directa de factores de nodulación en el pelo radicular (Roche *et al.*, 1991), sino debido a la expresión de la celulasa CelC2.

En la infección primaria llevada a cabo por las cepas 1021 y 1021C2^{+} en *M. truncatula*, observamos un aumento significativo del número de redirecciones polares en los pelos de las raíces inoculadas con la cepa 1021C2^{+}, como ya habíamos observado en alfalfa y trébol. Además en este caso, también se observa una disminución en el número de curlings en los pelos de las raíces inoculadas con la cepa 1021C2^{+}, que en su mayoría son aberrantes. Estas observaciones nos sugieren que la sobreexpresión de la celulasa CelC2, en este caso heteróloga, pueda estar induciendo respuestas de defensa en la planta. Robledo y colaboradores demostraron que había un ligero incremento en la producción de ROS en los pelos radiculares en la infección de trébol por la cepa superproductora (Robledo *et al.*, 2011). Sin embargo, en nuestros ensayos de microscopía utilizando NBT, método similar para la observación de la producción de ROS en pelos radicales al método que desarrollaron en este trabajo, no revelaron ninguna diferencia en la producción de ROS en los pelos radicales de *M. sativa* al inocular ambas cepas (1021 y 1021C2^{+}).

En un análisis de expresión de genes implicados en los primeros estadíos de la infección primaria (*vpy*) y en defensa de la planta a la infección (*chr7* y *rip1*), se comprobó que efectivamente había una respuesta defensiva por parte de la planta a la infección por la cepa 1021C2^{+}, si bien, esta respuesta de defensa no es suficiente para abortar por completo el proceso de infección. Se ha descrito que cambios en la estructura del exopolisacárido inducen respuestas de defensa en la planta y la formación de nódulos o

prenódulos vacíos, infectados en *M. sativa* (Niehaus *et al*., 1996). Por lo tanto, la correcta formación de exopolisacárido es imprescindible para la supresión de dichas defensas (Pellock *et al*., 2000). Nuestros datos anteriores indican que la celulasa CelC2 es inespecífica en la biosíntesis de celulosa y la colonización de superficies, no existiendo diferencias respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, esta ligera respuesta de defensa nos hace pensar que dicha celulasa está teniendo algún efecto o está alterando de algún modo la estructura de dichos exopolisacáridos, efecto que la planta es capaz de percibir. Además, la sobreregulación de la peroxidasa Rip1 observada en plantas inoculadas con 1021C2^{+}, indica que, a lo largo del tiempo, sigue expresándose este enzima, con lo que, aunque no la detectamos *in situ* con el método utilizado, la producción de ROS junto con la acción de la propia celulasa CelC2 confirmarían la existencia de estos fenotipos. Futuros estudios deben ser realizados para confirmar estas hipótesis, principalmente el conocimiento de los genes desregulados debido a la celulasa CelC2 de *Rhizobium* y CelC de *Ensifer* mediante la construcción de microarrays, además de otras determinaciones relacionadas con la producción de ROS.

En el paso siguiente a la infección primaria, es decir, la infección secundaria o liberación de las bacterias al final del canal de infección, podemos decir que los resultados obtenidos apuntan a la inespecificidad de la celulasa CelC2 en este proceso. Hemos comprobado que una sobreexpresión constitutiva de la enzima CelC2 actúa de manera similar en infección secundaria tanto en el sistema simbiótico *Rhizobium-Trifolium* como en *Ensifer-Medicago,* existiendo en ambos casos un número de nódulos fijadores menor en las plantas inoculadas con las cepas modificadas respecto de las plantas inoculadas con las cepas homólogas silvestres. La sobreexpresión de la celulasa CelC2 de *Rhizobium* en *E. meliloti* 1021 produce una incontrolada degradación al final del canal de infección, permitiendo que las bacterias se liberen al citoplasma de las células del nódulo sin rodearse de la membrana peribacteroidea y en consecuencia no se formen los típicos simbiosomas. Este comportamiento da lugar al característico efecto de desorganización en el interior del nódulo y como consecuencia no hay fijación de Nitrógeno lo que generará un menor desarrollo de la planta, como pudimos comprobar en el análisis de los resultados obtenidos en las medidas para el desarrollo vegetal. El menor desarrollo vegetal, ocasionado por una deficiencia en la fijación de Nitrógeno, se confirmó al repetir los experimentos en presencia de Nitrógeno, observando que el desarrollo vegatal se equiparaba en todos los tratamientos.

Además, hemos demostrado cómo una expresión constitutiva de dicha celulasa rizobiana en *E. medicae* WSM419 produce un efecto similar al observado en los casos anteriores, si bien no resulta ser un efecto tan severo. El número de nódulos de las plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con la cepa WSM419C2^{+} es también menor que el número de nódulos de las plantas inoculadas con la cepa salvaje, si bien, ambos valores son mayores a los de los casos anteriores. Este hecho puede ser debido a la mayor eficiencia de esta

cepa en la leguminosa de estudio, respecto de la pobre eficiencia que resultó tener la cepa *E. meliloti* 1021, coincidiendo con los resultados de Terpolilli y colaboradores, en los que se determina dicha cepa WSM419 como la más eficiente en *M. truncatula*, basándose en datos como la masa vegetal, la eficencia simbiótica y el mayor contenido en Nitrógeno de la parte aérea de estas plantas inoculadas con dicha cepa respecto a otras, entre las cuales se encontraba *E. meliloti* 1021 (Terpolilli *et al.*, 2008). En el interior nodular de las plantas inoculadas con la cepa WSM419C2$^+$ podemos observar canales de infección degradados al final de su estructura y bacterias sin diferenciar en el interior, al igual que en los otros casos, pero como ya se apunta en el inicio de este párrafo, el efecto no es tan drástico, encontrándose la zona de fijación del nódulo no tan fuertemente degradada.

El efecto de *E. medicae* WSM419EMC$^+$, cepa que sobreexpresa el ortólogo de la celulasa rizobiana encontrado en esa misma cepa, en la infección secundaria y el desarrollo nodular en *M. truncatula* fué similar al descrito anteriormente. Se observó que el número de nódulos sigue siendo inferior al número de nódulos de las plantas inoculadas con la cepa salvaje pero superior al número de nódulos de plantas inoculadas con las cepas superproductoras de la celulasa rizobiana CelC2. Además, en estas plantas inoculadas con dicha cepa, existen nódulos fijadores, atendiendo a su morfología y coloración, corroborado por la existencia de células invadidas en los cortes histológicos. Si bien, existen nódulos aberrantes y con el interior vacío, aunque mediante los cortes histológicos podemos observar que las bacterias se disponen en espacios intercelulares e incluso existen canales de infección con signos de degradación en su término, observándose bacterias sueltas sin diferenciarse. Además también se observa cierta degradación de las paredes celulares, aunque al igual que el en caso de la cepa WSM419C2$^+$, el efecto tampoco es severo, observándose el nódulo en general bastante íntegro.

En la literatura se ha reflejado en numerosas ocasiones, y como hemos apuntado anteriormente, que la deficiencia en la síntesis de exopolisacárido por parte del rizobio conlleva una deficiencia en la infección, por lo tanto los nódulos resultantes serán nódulos vacíos, los cuales presentaban infección intercelular, comprobándose además que existían reacciones de defensa por parte de la planta (Finan *et al.*, 1985; Skorupska *et al.*, 1995; Fraysse *et al.*, 2003; Wielbo *et al.*, 2004; Skorupska *et al.*, 2006; Gibson *et al.*, 2008). Los nódulos obtenidos con 1021C2$^+$, WSM419C2$^+$ y WSM419EMC$^+$ muestran infección intercelular, sobre todo en los nódulos de la cepa que sobreexpresa la celulasa CelC de *Ensifer*. La sobreexpresión de ambas celulasas provoca un efecto de desorganización de la zona de infección del nódulo, por lo que las bacterias no se rodean de membrana de origen vegetal y no se diferencian en bacteroides fijadores de Nitrógeno. Sin embargo, ocasionalmente, las bacterias se liberan del canal de infección, rodeándose de la membrana peribacteroidea y formando simbiosomas, aunque en mucha menor medida que con las cepas silvestres. La infección intercelular es la forma de infección más antigua

evolutivamente hablando, la cual es similar a la observada en la simbiosis *Aeschynomene-Bradyrhizobium*, que es independiente de factores de nodulación (Giraud *et al*., 2007; Madsen *et al*., 2010). Según nuestros resultados, la sobreexpresión de las celulasas CelC2 y CelC incrementa la entrada de la bacteria a través de espacios intercelulares. En los estudios realizados con estos mutantes superproductores hemos observado un gran número de bacterias alojadas en los espacios intercelulares, tanto de la raíz como del nódulo. Estas observaciones podrían indicar que la infectividad de estas cepas que sopreexpresan las distintas celulasas está incrementada, lo que podría ser beneficioso si se incorporara a un *Rhizobium* con buenas propiedades PGPR inoculado en no leguminosas (Rivera, TD, 2013).

Además, observando conjuntamente el desarrollo nodular en los 3 casos en los que sobreexpresamos la celulasa CelC2 y CelC, podemos concluir que los efectos en infección secundaria y desarrollo nodular observados en los nódulos de plantas inoculadas con cepas sobreproductoras, tanto la celulasa original como su ortólogo, son similares entre ellas aunque existe una diferencia en el grado de severidad mostrado en los distintos casos, siempre que hablemos de condiciones de cultivo en ausencia de Nitrógeno. Sin embargo, en presencia de Nitrógeno, la infección intracelular se encuentra bloqueada, al igual que la formación de canales de infección, simbiosomas y fijación de nitrógeno. Si bien, se bloquea su desarrollo, la inducción de nódulos no se ve afectada.

El efecto que se observa en los nódulos de plantas cultivadas en ausencia de Nitrógeno repercute en el desarrollo vegetal, siendo las plantas inoculadas con las cepas que sobreexpresan la celulasa CelC2 de un tamaño significativamente menor, con un menor peso seco (importante en forrajeras) y un menor contenido en Nitrógeno, respecto de las plantas inoculadas con sus cepas silvestres correspondientes, pero no menores, sino ligeramente mayores, a las plantas controles sin inocular. Sin embargo, las plantas inoculadas con la cepa WSM419EMC^{+} presentan un incremento en la longitud de la parte aérea con respecto a las demás plantas con distintas inoculaciones y plantas control sin inocular. No obstante, el peso seco en dichas plantas se mantiene similar al peso seco de las plantas inoculadas con la cepa WSM419. Además, el contenido en Nitrógeno en estas plantas es menor al contenido en la cepa silvestre, pero mayor al presentado por la cepa WSM419C2^{+}, lo cual es reseñable puesto que una gran parte de los nódulos producidos por la cepa WSM419EMC^{+} no eran fijadores.

La cepa WSM419 es bien conocida por su eficiencia simbiótica. En lineas generales, al analizar la concentración de los elementos esenciales en las partes aéreas de las plantas inoculadas con dicha cepa y sus derivados superproductores observamos que las plantas inoculadas con el derivado CelC2 de *Rhizobium* presentaban una disminución en la cantidad de Nitrógeno respecto de las plantas inoculadas con la cepa silvestre, en condiciones de ausencia de Nitrógeno. Cabe destacar, que este valor en ningún caso fué

menor que en las plantas control sin inocular, poniendo de manifiesto la ineficiencia en fijación de Nitrógeno debido a la desorganización nodular en estas cepas superproductoras. En el caso de las plantas inoculadas con la cepa WSM419EMC^{+} también se observa una disminución de Nitrógeno, aunque no alcanza los niveles de las plantas inoculadas con las cepas superproductoras de CelC2. En cuanto al fósforo y al potasio, los dos elementos que le siguen en importancia al Nitrógeno, no se observó en sus respectivas concentraciones una gran variación entre los distintos tratamientos.

Una vez analizada la influencia que las dos celulasas estudiadas tienen en las etapas de la interacción simbiótica, desde la colonización hasta el desarrollo vegetal y la similitud que existe entre la biosíntesis de celulosa bacteriana y vegetal decidimos introducir, mediante transformación de raíces, la celulasa CelC2 en *M. truncatula*.

En un primer lugar, los análisis comparativos *in silico* de la similitud de la celulosa sintasa CelA rizobiana y CesA de plantas muestran que existe similitud entre ellas, aunque cambian los dominios teniendo las celulosa sintasas de origen bacteriano un dominio adicional denominado PilZ, que resulta ser un dominio de unión a di GMP cíclico, regulador de la síntesis de celulosa, que no aparece en las CesA de las plantas. Existen estudios que promueven una evolución de la biosíntesis de celulosa por transferencia horizontal de genes, desde los procariotas hacia los organismos eucariotas superiores (Ross *et al*., 1991; Delmer *et al*., 1995; Pear *et al*., 1996)

Los datos obtenidos por Taylor y colaboradores, en los que se encontraba similitud entre las celulosa sintasas en procariotas con un subgrupo de celulosa sintasas en *Arabidopsis* (Taylor *et al*., 1999), y los datos obtenidos por Roberts y colaboradores, en los que encuentran similitud de celulosa sintasas de plantas superiores con algas unicelulares (Roberts *et al*., 2001), concuerdan con nuestros datos, ya que encontramos similitud tanto con plantas superiores como con algas verdes unicelulares cuando enfrentamos la secuencia de la proteína CelA rizobiana a las bases de datos. Además, encontramos una gran similitud entre dicho enzima bacteriano con las celulosa sintasas en cianobacterias, apoyando la idea de una evolución en la biosíntesis de celulosa de bacteria a planta.

En segundo lugar, se analizaron las similitudes entre la celulasa CelC rizobiana y las endoglucanasas en plantas, como por ejemplo las KORRIGAN, enfrentando las secuencias de las celulasas CelC2 de *Rhizobium* y CelC de *Ensifer* con las bases de datos. Al contrario que para CelA, no se encontraron similitudes con ninguna familia de plantas verdes superiores. Si bien, se encontró similitud con 2 proteínas, anotadas como *hypothetical protein,* en el alga verde unicelular (Chlorophyta) *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 (Blanc *et al*., 2012), la cual posee dominios GH8, típicos de celulasas bacterianas, y dominos GH9, encontrados tanto en celulasas vegetales como en celulasa de algunas bacterias degradadoras de celulosa y algunos endofitos de plantas. Además

existen cianobacterias, como *Synechocystis sp*, que posee dominios GH9 y como *Gloeocapsa sp*, que posee dominios GH8, por lo que podríamos decir que en el curso evolutivo, el dominio GH8 se restringe a procariotas, siendo el dominio GH9 el que está presente en plantas superiores. *C. subellipsoidea* conserva ambos tipos probablemente debido a la adaptación a condiciones extremas, ya que es capaz de formar biofilms, característica de las comunidades microbianas, como respuesta a las bajas temperaturas (Blanc *et al*., 2012).

Si bien no existe una relación directa de similitud de secuencia aminoacídica entre estas celulasas/endoglucanasas tanto de bacterias como de plantas, sí observamos una similitud de función entre ellas, apoyando un posible cambio evolutivo de dominio.

Debido a estos hallazgos, decidimos realizar ensayos que nos permitieron comprobar la posible relación de las celulasas bacterianas con las celulasas vegetales. Por ello, realizamos un ensayo de transformación de raíces de *Medicago truncatula* con el gen *celC*, cultivándolas en condiciones controladas de invernadero, en presencia de Nitrógeno y sin inocular las plantas. En este caso se comprobó que la celulasa CelC2 realmente influye en la planta, cuyo desarrollo vegetal resultó ser significativamente mayor al de las plantas transformadas con el vector vacío. Las plantas transformadas con el gen *celC* presentaron una mejor asimilación del Nitrógeno presente en la rizosfera. Estos datos sugieren que este enzima está implicado en el desarrollo vegetal, debido probablemente a su implicación en la biosíntesis de celulosa vegetal.

Los datos descritos en la literatura muestran la implicación de la celulasa KORRIGAN en la biosíntesis de celulosa vegetal (Nicol *et al*., 1998; Zuo *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2001; Molhoj *et al*., 2001), existiendo estudios que describen un incremento en el tamaño de los órganos de plantas de *Arabidopsis* transgénicas que sobreexpresan la endoglucanasa KOR-like PaPopCel1 de *Populus* (Park *et al.*, 2003). De una manera similar, se ha descrito que la sobreexpresión de la celulasa Cel1 de *Arabidopsis* en plantas transgénicas de *Populus tremula*, muestra un incremento en la longitud de los internodos y unas células suberosas elongadas (Shani *et al.*, 1999). Además, en estudios más recientes, se muestra la existencia de un incremento en la elongación celular en plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan PttCel9A1, ortólogo de dicha endoglucanasa en *Populus* (Takahashi *et al.*, 2009). Estos estudios sugieren la posible veracidad de esta hipótesis. Si bien nuestros resultados están en concordancia con lo descrito en la literatura, es necesario confirmarlos mediante una transformación estable de la planta.

Para determinar la influencia de la celulasa CelC2 de *Rhizobium* en la simbiosis fijadora de Nitrógeno, procedimos a cultivar las plantas con raíces transformadas en ausencia de Nitrógeno e inoculadas con *E. meliloti* 1021. El fenotipo observado, tanto en infección secundaria como en el desarrollo vegetal, en estas plantas transformadas con el gen *celC* e inoculadas con la

cepa silvestre 1021 en ausencia de Nitrógeno es similar al fenotipo mostrado por plantas sin transformar inoculadas con la cepa 1021C2^{+}. Cabe destacar que no se observó alteración en los eventos en infección primaria, lo que corrobora la especificidad de hospedador de esta enzima. Además los ensayos de inmunolocalización confirmaron que la acción de este enzima está restringida a la zona de infección, donde se manifiesta el típico fenotipo ocasionado por la sobreexpresión de CelC2, es decir, desorganización celular en el interior del nódulo, debido a la alteración del fenotipo Bar. Además, utilizando mutantes *nip* en *Medicago truncatula* (Veereshlingam *et al.,* 2004), comprobamos que la celulasa CelC2 es específica de sustrato. *nip3* posee alterado el fenotipo Bar, esta vez debido a cambios conformacionales de las paredes del canal de infección, el cual tiene más grosor y las bacterias no se liberan al final del canal de infección. Tanto al inocular estas plantas *nip3* con 1021C2^{+} como al transformar sus raíces con el gen *celC*, no se observó cambio en el fenotipo Bar respecto a las condiciones normales. Este hecho nos hace hipotetizar sobre la deposición de otro tipo de compuestos, como por ejemplo la callosa, a la cual CelC2 no puede degradar.

A modo de resumen, los resultados más significativos presentados en esta memoria de tesis doctoral son los siguientes:

- Capítulo 1

Por primera vez se realiza un estudio *in silico* completo de la presencia del operón implicado en biosíntesis de celulosa *celABC* en el género *Ensifer*, encontrándose similitudes en miembros de las especies *E. medicae*, *E. adhaerens*, *E. fredii* y *E. meliloti*, cuya localización puede ser plasmídica o cromosómica. Además, se caracteriza por vez primera la celulasa CelC en *E. medicae* WSM419, codificada por el gen *celC*.

- Capítulo 2

La celulasa CelC2 es inespecífica en colonización de superficies abióticas *in vitro* e inespecífica en colonización de superficies radiculares. Sin embargo, afecta a la formación de "caps" en el ápice de los pelos radiculares, no formándose dichos "caps" en presencia de celulasa CelC2.

- Capítulo 3

La celulasa CelC2 es específica de hospedador en infección primaria. Se propone un nuevo fenotipo denominado fenotipo RaT que aumenta significativamente en número en las plantas inoculadas con la cepa superproductora. El fenotipo RaT se debe a la acción de la celulasa CelC2, siendo independiente de los Factores de Nodulación. Además, una sobreexpresión de la celulasa CelC2 induce respuestas de defensa en la planta, aunque esta respuesta no es suficiente para abortar el proceso de infección.

- Capítulo 4

La celulasa CelC2 es inespecífica en infección secundaria y desarrollo nodular. Las celulasas CelC2 de *Rhizobium* y CelC de *Ensifer* producen en todos los casos una desorganización interna del nódulo a nivel de la zona de infección. Esta desorganización es de un menor grado de severidad en los nódulos producidos por la cepa que sobreexpresa CelC de *Ensifer*.

- Capítulo 5

La desorganización interna de los nódulos mostrados en las plantas inoculadas con las cepas que sobreexpresan CelC2 conlleva una ineficiencia en la fijación de Nitrógeno, lo cual afecta al desarrollo vegetal de dichas plantas, siendo significativamente menor que el desarrollo mostrado por las plantas inoculadas con las cepas silvestres. Sin embargo, este desarrollo es ligeramente mayor que en las plantas control sin inocular. Curiosamente, el desarrollo de las planta inoculadas con la cepa sobreexpresora de CelC de *Ensifer* es similar al de las plantas inoculadas con la cepa silvestre, probablemente debido al menor grado de desorganización en la estructura nodular.

- Capítulo 6

Los mecanismos de biosíntesis de celulosa son similares en plantas como en bacterias. Aunque similares en función y con cierta similitud de secuencia, la celulosa sintasa CesA en plantas y CelA en bacterias difieren en la presencia del dominio PilZ, solamente en bacterias. Curiosamente, la celulasa CelC y las endoglucanasas, como por ejemplo las KORRIGAN, en plantas, aún teniendo una función similar, no muestran similitud alguna. Sin embargo, existe similitud con dos proteínas, no anotadas aún, en *Coccomyxa subellipsoidea* C-169, alga clorófita unicelular que forma biofilms en condiciones desfavorables. Estos datos apuntan a una posible evolución de la biosíntesis de celulosa desde los procariotas hacia las plantas verdes superiores. Mediante transformación de raíces de *M. truncatula*, confirmamos la posible implicación de la celulasa CelC2 en la biosíntesis de celulosa vegetal, ya que el desarrollo vegetal es mayor en estas plantas. Además, cultivando las raíces transformadas en ausencia de Nitrógeno e inoculándolas con *E. meliloti* 1021, mostraron un fenotipo similar en infección secundaria y desarrollo nodular y vegetal al de plantas sin transformar inoculadas con la cepa 1021C2^{+}.

CONCLUSIONES



A continuación, se exponen las principales conclusiones extraídas de esta tesis doctoral:

1. El operón *celABC*, implicado en la biosíntesis de celulosa en bacterias, está ampliamente distribuido en *Rhizobium* y géneros relacionados. Los análisis bioinformáticos realizados predicen una elevada similitud entre los genes que conforman los operones *celABC* de *Rhizobium* y de *Ensifer*. La localización de dicho operón, cromosómica en *Rhizobium* y plasmídica en *Ensifer*, con la excepción de *E. fredii* USDA257 y *E. adhaerens* OV14, sugiere una transferencia horizontal de los genes que conforman el operón ocurrida en algún momento de la evolución. La coincidencia en los dominios proteicos de los genes *celABC* en los dos géneros apoya la hipótesis de una transferencia horizontal de genes hacia *Ensifer*.

2. Mediante fusiones transcripcionales se ha comprobado la existencia de una secuencia promotora/reguladora del gen *celC* contenida en el gen *celB*, que únicamente promueve la expresión del gen *celC* en presencia de la planta en las zonas donde se lleva a cabo la infección primaria y la infección secundaria.

3. La celulasa CelC2 es inespecífica en colonización de superficies, tanto bióticas como abióticas, siendo su efecto similar en diferentes hospedadores, confirmándose éste como un proceso totalmente independiente de la infección rizobiana. No obstante, la celulasa CelC2 impide la formación de "caps" en el ápice de los pelos radiculares, evitando en cierto grado la correcta infección via canónica.

4. La celulasa CelC2 muestra especificidad de hospedador en infección primaria. Sin embargo, la expresión heteróloga de la celulasa CelC2, aumenta significativamente el número de redirecciones polares (RaT) en los pelos radiculares, independientemente del hospedador.

5. Las reacciones de defensa de la planta a la infección con transformantes que expresan la celulasa CelC2 no son suficientes para abortar la infección, a pesar de que existe una desregulación en la expresión de genes implicados en respuesta a ROS.

6. La celulasa CelC2 es inespecífica de hospedador en infección secundaria y desarrollo nodular, produciendo una desorganización interna por la ruptura de paredes de las células del nódulo pertenecientes a la zona de infección. Las bacterias no se recubren de la membrana de origen vegetal y no se diferencian, por lo que no se observan simbiosomas y los nódulos no son eficientes en fijación de Nitrógeno. El desarrollo vegetal de las plantas es significativamente menor, al igual que los parámetros analizados. La adición de Nitrógeno revierte dicho fenotipo, confirmando la implicación de dicha celulasa.

7. El análisis comparativo de las celulosa sintasas y celulasas implicadas en la biosíntesis de celulosa vegetal y bacteriana apoyan la hipótesis de una posible evolución desde los procariotas hacia las plantas verdes superiores.

8. La expresión *in planta* de la celulasa CelC2 confirma su posible implicación en la biosíntesis de celulosa vegetal, suponiendo un aumento del desarrollo vegetativo de la planta.

9. En ausencia de Nitrógeno asimilable en la rizosfera, el fenotipo mostrado por las plantas que expresan la celulasa CelC2 confirma la ineficiencia en Fijación de Nitrógeno, siendo similar al fenotipo mostrado por plantas inoculadas con los transformantes que expresan, tanto homóloga como heterólogamente, el gen *celC*.

BIBLIOGRAFÍA



Ahemad M, Kibret M. (2013). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. Journal Of King Saud University - Science 1 20.

Aizawa T., Ve N.B., Nakajima M. and Sunairi M. (2010). *Burkholderia heleia* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from an aquatic plant, *Eleocharis dulcis*, that grows in highly acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60:1152-1157.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215:403 410.

Amarger N, Macheret V, Laguerre G. (1997). *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. Int J Syst Bacteriol 47:996 1006.

Andrades-Moreno L, Del Castillo I, Parra R, Doukkali B, Redondo-Gómez S, Pérez-Palacios P, et al. (2014). Prospecting metal-resistant plant-growth promoting rhizobacteria for rhizoremediation of metal contaminated estuaries using *Spartina densiflora*. Environ Sci Pollut Res Int 21:3713 3721.

Ané J-M, Kiss GB, Riely BK, Penmetsa RV, Oldroyd GED, Ayax C, et al. (2004). *Medicago truncatula* DMI1 Required for Bacterial and Fungal Symbioses in Legumes. Science Signaling 303:1364.

Ardley J.K., Parker M.A., De Meyer S.E., Trengove R.D., O'Hara G.W., Reeve W.G., Yates R.J., Dilworth M.J., Willems A., Howieson J.G. (2011). *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov., and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are Alphaproteobacterial root nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. Int J Syst Evol Microbiol. Published on line.

Ardourel M, Demont N, Debelle F, Maillet F, Billy F, Promé JC, Denarie J, 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. The Plant Cell Vol. 6, 1357-1374.

Arjun JK, Harikrishnan K. (2011). Metagenomic analysis of bacterial diversity in the rice rhizosphere soil microbiome. Biotechnol Bioinform Bioeng.1(3):361-367

Arrighi J-F, Godfroy O, de Billy F, Saurat O, Jauneau A, Gough C. (2008). The RPG gene of *Medicago truncatula* controls *Rhizobium*-directed polar growth during infection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. vol. 105 no. 28; 9817 9822

Ausmees N, Jonsson H, Hoglund S, Ljunggrenl H, and Lindberg M. (1999). Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in

Rhizobium leguminosarum bv. trifolii. Microbiology,145, 1253-1 262

G M Ballance RAD. and Dixon RA (1995). *Medicago sativa* cDNAs encoding chalcone reductase. Plant Physiol 107:1027.

Bashan Y, Holguin G, de-Bashan LE. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Canadian Journal of Microbiology, 50 (8), 521-577.

Bautista V.V., Monsalud R.G. and Yokota A. (2010). *Devosia yakushimensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Pueraria lobata* Willd. Ohwi. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. , 60: 627-632.

Ben Amor B, Shaw SL, Oldroyd GED, Maillet F, Penmetsa RV, Cook D, et al. (2003). The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. Plant J 34:495 506.

Benedito VA, Torres-Jerez I, Murray JD, Andriankaja A, Allen S, Kakar K, Wandrey M, Verdier J, Zuber H, Ott T, Moreau S, Niebel A, Frickey T, Weiller G, He J, Dai X, Zhao PX, Tang Y, and Udvardi MK. (2008). A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. Plant J 55:504 513.

Benson DR, Silvester WB. (1993). Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. Microbiol Rev 57:293 319.

Berge O, Lodhi A, Brandelet G, Santaella C, Roncato MA, Christen R, et al. (2009). *Rhizobium alamii* sp. nov., an exopolysaccharide-producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres. Int J Syst Evol Microbiol 59:367 372.

Bibi F., Chung E.J., Khan A., Jeon C.O. and Chung Y.R. (2012). *Rhizobium halophytocola* sp. nov., isolated from the root of a coastal dune plant. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62:1997-2003.

Bibikova TN, Blancaflor EB, Gilroy S. (1999). Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. Plant J 17:657 665.

Blanc G, Agarkova I, Grimwood J, Kuo A, Brueggeman A, Dunigan DD, et al. (2012). The genome of the polar eukaryotic microalga *Coccomyxa subellipsoidea* reveals traits of cold adaptation. Genome Biol 13:R39.

Boisson-Dernier A., Chabaud M., Garcia F., Bécard G., Rosenberg C., Barker DG. (2001). *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. Mol Plant Microbe Interact 14:695 700.

Brewin NJ. (1991). Development of the legume root nodule. Annu Rev Cell

Biol. 1;7:191-226.

Brewin NJ. (2004). Plant Cell Wall Remodelling in the *Rhizobium* Legume Symbiosis. Critical Reviews in Plant Sciences 23:293 316.

Brockwell J and Hely FW (1966) Symbiotic characteristics of *Rhizobium meliloti*: and appraisal of the systematic treatment of nodulation and nitrogen fixation interactions between hosts and Rhizobia of diverse origins. Australian Journal of Agricultural Research 17 , 885 899.

Brummell DA, Catala C, Lashbrook CC, Bennett AB. (1997). A membrane-anchored E-type endo-1,4-beta-glucanase is localized on Golgi and plasma membranes of higher plants. Proc Natl Acad Sci USA 94:4794 4799.

Carpita NC. (2011). Update on Mechanisms of Plant Cell Wall Biosynthesis: How Plants Make Cellulose and Other (1->4)- -D-Glycans. Plant Physiol 155:171 184.

Carro L, Flores-Félix JF, Cerda-Castillo E, Ramirez-Bahena MH, Igual JM, Tejedor C, Velazquez E., Peix A. (2013) *Paenibacillus endophyticus* sp. nov., isolated from nodules of *Cicer arietinum*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2013), 63, 4433-4438.

Casida L Jr. (1982). *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. International Journal of Systematic and ….

Chabaud M, de Carvalho-Niebel F, Barker DG. (2003). Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. Plant Cell Rep 22:46 51.

Chabot R, Antoun H, Cescas MP. (1996). Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. phaseoli. Plant and Soil 184:311 321.

Chahboune R., Carro L., Peix A., Barrijal S., Velázquez E. and Bedmar E.J. (2011). *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:2922-2927.

Chang Y.L., Wang J.Y., Wang E.T., Liu H.C., Sui X.H. and Chen W.X. (2011). *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 2496-2502.

Chen W, Yan G. (1988). Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology,p. 392-397

Chen WX, Tan ZY, Gao JL, Li Y, Wang ET. (1997). *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. Int J Syst Bacteriol 47:870 873.

Chen WM. (2006). *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa spp*. from Taiwan and South America. Int J Syst Evol Microbiol 56:1847 1851.

Chen W.M., De Faria S.M., James E.K., Elliott G.N., Lin K.Y., Chou J.H., Sheu S.Y., Cnockaert M., Sprent J.I. and Vandamme P. (2007). *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:1055-1059.

Chen W.M., De Faria S.M., Chou J.H., James E.K., Elliott G.N., Sprent J.I., Bontemps C., Young J.P.W. and Vandamme P. (2008). *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniifolia*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:2174-2179.

Chen W.M., Zhu W.F., Bontemps C., Young J.P.W. and Wei G.H. (2010). *Mesorhizobium alhagi* sp. nov., isolated from wild *Alhagi sparsifolia* in north-western China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60:958-962.

Chen W.M., Zhu W.F., Bontemps C., Young J.P.W. and Wei G.H. (2011). *Mesorhizobium camelthorni* sp. nov., isolated from *Alhagi sparsifolia*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:574-579.

Cheng HP, Walker GC. (1998). Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. J Bacteriol 180:5183 5191.

Crane C, Wright E, Dixon R. (2006). Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens*-transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. Planta. 223: 1344 1354

Cocking EC. (1985). Protoplasts from root hairs of crop plants. Nature Biotechnology 3, 1104 1106.

Coenye T., Laevens S., Gillis M. and Vandamme P. (2001). Genotypic and chemotaxonomic evidence for the reclassification of *Pseudomonas woodsii* Smith 1911 Stevens 1925 as *Burkholderia andropogonis* Smith 1911 Gillis et al.,. 1995. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:183-185.

Cook D, Dreyer D, Bonnet D, Howell M, Nony E, VandenBosch K. (1995). Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. The Plant Cell 7:43 55.

Cook D. (1999). *Medicago truncatula*-a model in the making! Current Opinion in Plant Biology, 2:301 304

Cooper, J.E. (2004) Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. Adv Bot Res 41, 1 62.

Cooper JE. (2007). Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. J. Appl. Microbiol. 103:1355 1365.

Cowling E, Galloway J, Furiness C, Barber M, Bresser T, Cassman K, et al. (2001). Optimizing nitrogen management in food and energy production and environmental protection: summary statement from the Second International Nitrogen Conference. In:Vol. 1 Suppl 2, pp. 1 9.

Dale A. Callaham, John G. Torrey (1981) The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. Canadian Journal of Botany, 59(9): 1647-1664.

Davey ME, O'toole GA. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev 64:847 867.

Dazzo FB, Truchet GL, Sherwood JE, Hrabak EM, Abe M, Pankratz SH. (1984). Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis. Appl Environ Microbiol 48:1140 1150.

Dazzo, FB., Hollingsworth, RI., Philip, S., Smith, KB., Welsch, MA., Salzwedel, J., Morris, P., McLaughlin, L. (1987).Involvement of pSYM Nodulation Genes in Production of Surface and Extracellular Components of Rhizobium trifolii Which Interact With White Clover Root Hairs. Molecular genetics of plant-microbe interactions. V 3. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture.

Dazzo F., Truchet G., Hollingsworth R., Hrabak EM., Pankratz HS., Philip-Hollingsworth S., Salzwedel JL., Chapman K., Appenzeller L., Squartini A., Gerhold D. and Orgambide G. (1991). *Rhizobium* lipopolysaccharide modulates infection thread development in white clover root hairs. Journal of Bacteriology 173, 17:5371-5384.

Dazzo FB, Orgambide GG, Philip-Hollingsworth S, Hollingsworth RI, Ninke KO, Salzwedel JL. (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.

Debelle F., Moulin L, Mangin B, Denarie J, Boivin C. (2001) nod Genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume simbiosis. Acta Biochimica Polonica. Vol. 48 No. 2; 359 365.

Degefu T, Wolde-meskel E, Liu B, Cleenwerck I, Willems A and Frostegrad A. (2013). *Mesorhizobium shonense* sp. nov., *Mesorhizobium hawassense* sp. nov. and *Mesorhizobium abyssinicae* sp. nov., isolated from root nodules of different agroforestry legume trees. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63, 1746 1753.

De Hoff PL, Brill LM, Hirsch AM. (2009). Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. Mol Genet Genomics 282:1 15.

de Lajudie P, Willems A, Nick G, Moreira F, Molouba F, Hoste B, et al. (1998). Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarium* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 48 Pt 2:369 382.

De Meyer SF, Cnockaert M, Ardley JK, Tregove RD, Garau G, Howieson JG and Vandamme P. (2013). *Burkholderia rhynchosiae* sp. nov. isolated from *Rhynchosia ferulifolia* root nodules from South Africa. Int J Syst Bacteriol 63:3944-3949.

Delamuta JRM, Ribeiro RA, Ormeño-Orillo E, Soares Melo I, Martinez-Romero E and Hungria M. (2013). Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 63:3342 3351.

Delmer DP, Amor Y. (1995). Cellulose biosynthesis. The Plant Cell 7:987.

Dickstein R, Bisseling T, Reinhold VN, Ausubel FM. (1988). Expression of nodule-specific genes in alfalfa root nodules blocked at an early stage of development. Genes & Development 2:677 687.

Dreyfus B., Garcia J.L. and Gillis M. (1988). Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. Int. J. Syst. Bacteriol. 38:89-98.

Doblin MS, Kurek I, Jacob-Wilk D, Delmer DP. (2002). Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. Plant Cell Physiol 43:1407 1420.

Downie JA. (2010). The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. FEMS Microbiol. Rev. 34:150 170.

Duran D, Rey L, Mayo J, Zuñiga-Davila D, Imperial J, Ruiz-Argueso T, Martinez-Romero E and Ormeño-Orrillo E. (2014). *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. IJSEM in press. Doi:10.1099/ijs.0.060426-0.

Epstein E. and Bloom AJ. (2005) Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Ehrhardt D, Wais R. (1996). Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. Cell.Vol. 85, 673 681

Erisman JW, Galloway J, Seitzinger S, Bleeker A. (2011). Reactive nitrogen in the environment and its effect on climate change. Current Opinion in Environmental Sustainability 3:281 290

Esseling JJ, Emons AMC. (2004). Dissection of Nod factor signalling in legumes: cell biology, mutants and pharmacological approaches. J Microsc 214:104 113.

Estabrook EM, Sengupta-Gopalan C. (1991). Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during soybean nodule development. The Plant Cell Online.

Flores-Félix JF, Carro L, Velazquez E., Valverde A, Cerda-Castillo E, García-Fraile P., Rivas R. (2013) *Phyllobacterium endophyticum* sp. nov., isolated from nodules of *Phaseolus vulgaris*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2013), 63, 821 826.

Flores-Félix JF, Menéndez E, Rivera LP, Marcos-García M., Martínez-Hidalgo P., Mateos PF., Martínez-Molina E., Velazquez E., García-Fraile P., Rivas R. (2013). Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 176, 876 882.

Figurski DH., and Helinski DR. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 1648-1652.

Finan, T.M., A.M. Hirsch, J.A. Leigh, E. Johansen, G.A. Kuldau, S. Deegan, G.C. Walker, and E. Signer. (1985). Symbiotic mutants of *Rhizobium mehloti* that uncouple plant from bacterial differentiation. Cell 40: 869-877.

Fischer H. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 58, No. 3 pp 352-386

Fonseca MB, Peix A, de Faria SM, Mateos PF, Rivera LP, Simoes-Araujo JL, Costa Franca MG, dos Santos Isaias RM, Cruz C, Velázquez E, Scotti MR, Sprent JI, and James EK (2012). Nodulation in *Dimorphandra wilsonii* Rizz. (Caesalpinioideae), a threatened species native to the Brazilian Cerrado. PLoS ONE 7:e49520.

Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JDG et al.: Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. Nature 2003, 422:442-446.

Frank B. 1889. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft. 7:332-346.

Fraysse N, Couderc F, Poinsot V. (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. Eur J Biochem 270:1365 1380.

Fujishige NA, Kapadia NN, Hirsch AM. (2006). A feeling for the micro-

organism: structure on a small scale. Biofilms on plant roots. Botan J Linn Soc 150:79 88.

Gage DJ. (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., T.M. Finan, S.R. Long, A. Puhler, P. Abola, F. Ampe, F. Barloy-Hubler, M.J. Barnett, A. Becker, P. Boistard, G. Bothe, M. Boutry, L. Bowser, J. Buhrmester, E. Cadieu, D. Capela, P. Chain, A. Cowie, R.W. Davis, S. Dreano, et al. (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science 293:668 672.

Galloway, J. (2005). The global nitrogen cycle: Past, present and future. Science in China Series C: Life Sciences 48 Special Issue 669-677.

Gao JL. (2004). *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. Int J Syst Evol Microbiol 54:2003 2012.

García-Fraile P, Rivas R, Willems A, Peix A, Martens M, Martínez-Molina E, et al. (2007). *Rhizobium cellulosilyticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba*. Int J Syst Evol Microbiol 57:844 848.

García-Fraile P, Carro L, Robledo M, Ramírez-Bahena MH, Flores-Félix J-D, Fernández MT, et al. (2012). *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. PLoS ONE 7:e38122.

García-Rodríguez FM, 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.

Glazebrook J, Walker GC. (1989). A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. Cell 56:661 672.

Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, et al. (2005). Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the Cross-Legume Advances Through Genomics Conference. In:Vol. 137, pp. 1228 1235.

Ghosh W. and Roy P. (2006). *Mesorhizobium thiogangeticum* sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph from rhizosphere soil of an Indian tropical leguminous plant. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:91-97.

Gibson KE, Kobayashi H, Walker GC. (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. Annu Rev Genet 42:413 441.

Gillis M., Van T.V., Bardin R., Goor M., Hebbar P., Willems A., Segers P., Kersters K., Heulin T. and Fernandez M.P. (1995). Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N2-fixing isolates from rice in Vietnam. Int. J. Syst. Bacteriol. 45:274-289.

Giraud E, Moulin L, Vallenet D, Barbe V, Cytryn E, Avarre JC, et al. (2007). Legumes Symbioses: Absence of Nod Genes in Photosynthetic Bradyrhizobia. Science 316:1307 1312.

Graham PH and Vance CP. (2003). Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. Plant Physiol 131:872 877.

González JE, Reuhs BL, Walker GC. (1996). Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. roc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 93, pp. 8636-8641.

Gonzalez V, Santamaría RI, Bustos P, Hernandez-Gonzalez I, Medrano-Soto A, Moreno-Hagelsieb G, Janga SC, Ramírez MA, Jiménez-Jacinto V, Collado-Vides J, and Dávila G. (2006). The partitioned *Rhizobium etli* genome: Genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. Proc Natl Acad Sci USA 103:3834 3839.

Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, et al. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. Nucleic acids 40, Database issue. doi:10.1093/nar/gkr944.

Grierson C, Schiefelbein J. (2002). Root hairs. Arabidopsis Book 1:e0060.

Gu C.T., Wang E.T., Tian C.F., Han T.X., Chen W.F., Sui X.H. and Chen W.X. (2008). *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Lespedeza* root nodules. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:1364-1368

Guan S.H., Chen W.F., Wang E.T., Lu Y.L., Yan X.R., Zhang X.X. And Chen W.X. (2008). *Mesorhizobium caraganae* sp. nov., a novel rhizobial species nodulated with *Caragana spp*. in China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 58:2646-2653.

Gutiérrez-Zamora M. and Martínez-Romero E. (2001). Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). Journal of biotechnology 91:117 126.

Haag AF, Baloban M, Sani M, Kerscher B, Pierre O, Farkas A, et al. (2011). Protection of *Sinorhizobium* against Host Cysteine-Rich Antimicrobial Peptides Is Critical for Symbiosis Dangl, JL, ed. PLoS Biol 9:e1001169.

Han T.X., Han L.L., Wu L.J., Chen W.F., Sui X.H., Gu J.G., Wang E.T. and Chen W.X. (2008). *Mesorhizobium gobiense* sp. nov. and *Mesorhizobium tarimense* sp. nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of

Xinjiang, China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:2610-2618.

Han T.X., Wang E.T., Wu L.J., Chen W.F., Gu J.G., Gu C.T., Tian C.F. And Chen W.X. (2008). *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. Int. J. Sy. Evol. Microbiol. 58:1693-1699.

Haney CH, Long SR. (2010). Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. Proc Natl Acad Sci USA 107:478 483.

Heidstra R, Geurts R, Franssen H, Spaink HP, van Kammen A, Bisseling T. (1994). Root Hair Deformation Activity of Nodulation Factors and Their Fate on *Vicia sativa*. Plant Physiol 105:787 797.

Henrissat B and Bairoch A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. Biochem. J. 316, 695-696 - BJ Letters - BJ Letters. Biochem J.

Henrissat B, Davies G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. Curr Opin Struct Biol 7:637 644.

Herridge D, Peoples M. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. Plant and Soil. 311:1 18

Hirsch P. and Muller M. (1985). *Blastobacter aggregatus* sp. nov., *Blastobacter capsulatus* sp. nov. and *Blastobacter denitrificans* sp. nov. new budding bacteria from freshwater habitats. System App Microbiol. 6, 281-286.

Hirsch AM, Fang Y, Brill LM, Wycoff KL, Niner BM, Brandt JM, Van Rhijn P (1995) Nodule Development in Legumes The Early Stages: Involvement of Early Nodulins, Lectins, and Other Proteins.In: Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture Volume 27, 1995, pp 299-304

Hirsch A. (1999). Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. Current Opinion in Plant Biology.

Hofgen R, Willmitzer L. (1988). Storage of competent cells for Agrobacteriumtransformation. Nucleic Acids Res 16:9877 9877.

Hollingsworth RI, Dazzo FB, Hallenga K, Musselman B. (1988). The complete structure of the trifoliin A lectin-binding capsular polysaccharide of *Rhizobium trifolii* 843. Carbohydr. Res. 172:97 112.

Hou B.C., Wang E.T., Li Jr Y., Jia R.Z., Chen W.F., Gao Y., Dong R.J. And Chen W.X. (2009). *Rhizobium tibeticum* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Trigonella archiducis-nicolai* Širj. Vassilcz. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 3051-3057.

Hubbell D, Morales V. (1978). Pectolytic enzymes in *Rhizobium*. Applied and

Environmental Microbiology, Vol.35,No.1 p.210-213

Hubbell D. (1981) Legume Infection by *Rhizobium*: A Conceptual Approach. BioScience (1981) 31 (11): 832-837.

Hunter W.J., Kuykendall L.D. and Manter D.K. (2007). *Rhizobium selenireducens* sp. nov.: a selenite-reducing α-Proteobacteria isolated from a bioreactor. Curr. Microbiol. 55: 455-460.

Hurek T, Handley LL, Reinhold-Hurek B, Piché Y. (2002). *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. Mol Plant Microbe Interact 15:233 242.

Imran A., Hafeez F.Y., Frühling A., Schumann P., Malik K.A. And Stackebrandt E. (2010). *Ochrobactrum ciceri* sp. nov., isolated from nodules of *Cicer arietinum*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60:1548-1553.

Islam M.S., Kawasaki H., Muramatsu Y., Nakagawa Y. and Seki T. (2008). *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan. Biosci. Biotechnol. Biochem. 72:1416-1429.

Jarvis B, Downer H. (1992). Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. Int J Syst Bacteriol

Jarvis B, van Berkum P, Chen WX, Nour SM, Fernandez MP, Cleyet-Marel JC, et al. (1997). Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. Int J Syst Bacteriol 47:895 898.

Jimenéz-Zurdo J, Mateos P, Dazzo F, Martínez-Molina E. (1996). Cell-bound cellulase and polygalacturonase production by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. Soil Biology and Biochemistry. Vol. 28, No. 7, pp. 917-921,

Jones MA, Raymond MJ, Smirnoff N. (2006). Analysis of the root-hair morphogenesis transcriptome reveals the molecular identity of six genes with roles in root-hair development in Arabidopsis. The Plant Journal 45:83 100.

Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME, Walker GC. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. Nature Reviews Microbiology 5:619 633.

Jones P, Binns D, Chang H-Y, Fraser M, Li W, McAnulla C, et al. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. Bioinformatics 30:1236 1240.

Jourand P, Giraud E, Bena G, Sy A, Willems A, Gillis M, Dreyfus B, deLajudie P. (2004). *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic,

facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. Int J Syst Evol Microbiol 54:2269 2273.

Jordan D.C. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. Int. J. Syst. Bacteriol. 32:136-139.

Kalo P, Gleason C, Edwards A, Marsh J, Mitra RM, Hirsch S, et al. (2005). Nodulation Signaling in Legumes Requires NSP2, a Member of the GRAS Family of Transcriptional Regulators. Science Signaling 308:1786.

Kaneko T, Minamisawa K, Isawa T, Nakatsukasa H, Mitsui H, Kawaharada Y, et al. (2010). Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte Azospirillum sp. B510. DNA Res 17:37 50.

Karimi M., Inz D., Depicker A. (2002). GATEWAY TM vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. Trends in Plant Science 7:193 195.

Kaur J, Verma M, Lal R. (2011). *Rhizobium rosettiformans* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site, and reclassification of *Blastobacter aggregatus* Hirsch and Muller 1986 as *Rhizobium aggregatum* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 61:1218 1225.

Kelley LA, Sternberg MJE. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. Nat Protoc 4:363 371.

Kneip C, Lockhart P, Voß C. Maier UG. (2007). Nitrogen fixation in eukaryotes New models for symbiosis. BMC Evolutionary Biology 7:55

Kovach M.E., Phillips R.W., Elzer P.H., Roop R.M., Peterson K.M. (1994). pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. BioTechniques 16:800 802.

Kuykendall L.D., Saxena B., Devine T.E. And Udell S.E. (1992). Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. Can. J. Microbiol. 38:501-505.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227:680-685.

Lefebvre B, Timmers T, Mbengue M, Moreau S, Hervé C, Tóth K, et al. (2010). A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. Proc Natl Acad Sci USA 107:2343 2348.

Leong, S.A., Williams, P.H., Ditta, G.W. (1985). Analysis of the 50 regulatory region of the gene for d-aminolevulinic acid synthetase of *Rhizobium meliloti*. Nucleic Acids Res. 13, 5965 5976.

Lesser MP, Mazel CH, Gorbunov MY, Falkowski PG. (2004). Discovery of symbiotic nitrogen-fixing cyanobacteria in corals. Science 305:997 1000.

Lévy J, Bres C, Geurts R, Chalhoub B, Kulikova O, Duc G, Journet EP, Ané JM, Lauber E, Bisseling T, Dénarié J, Rosenberg C, Debellé F. (2004) A putative Ca2+ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. Science. 303(5662):1361-4.

Ljunggren, H., and G. Fahraeus. (1961). The role of polygalacturonase in root hair invasion by nodule bacteria. J.Gen.Microbiol.26:521-528.

Li Q.Q., Wang E.T., Chang Y.L., Zhang Y.Z., Zhang Y.M., Sui X.H., Chen W.F. and Chen W.X. (2011). *Ensifer sojae* sp. nov., isolated from root nodules of *Glycine max* grown in saline-alkaline soils. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:1981-1988.

Limpens E, Bisseling T. (2003). Signaling in symbiosis. Current Opinion in Plant Biology 6:343 350.

Limpens E, Mirabella R, Fedorova E, Franken C, Franssen H, Bisseling T and Geurts R. (2005). Formation of organelle-like N2-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102:10375 10380.

Lin D.X., Wang E.T., Tang H., Han T.X., He Y.R., Guan S.H. and Chen W.X. (2008). *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:1409-1413.

Lin D.X., Chen W.F., Wang F.Q., Hu D., Wang E.T., Sui X.H. And Chen W.X. (2009). *Rhizobium mesosinicum* sp. nov., isolated from root nodules of three different legumes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:1919-1923

Lindström K. (1989). *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. Int J Syst Bacteriol 39:365 367.

Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(_DDCT) Method. Methods 25: 402 408.

Lloret L., Ormeño-Orrillo E., Rincón R., Martínez-Romero J., Rogel-Hernández M.A. and Martínez-Romero E. (2007). *Ensifer mexicanus* sp. nov. a new species nodulating *Acacia angustissima* Mill. Kuntze in Mexico. Syst. Appl. Microbiol. 30:280-290.

Lopez-Lopez A, Rogel-Hernandez MA, Barois I, Ortiz-Ceballos AI, Martinez J, Ormeño-Orrillo E and Martinez-Romero E. (2011). *Rhizobium grahamii* sp. nov. from *Dalea leporina*, *Leucaena leucocephala*, *Clitoria ternatea* nodules, and *Rhizobium mesoamericanum* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris*, siratro, cowpea and *Mimosa pudica* nodules. Int J Syst Bacteriol . 62:2264 2271.

Lu Y.L., Chen W.F., Han L.L., Wang E.T. and Chen W.X. (2009). *Rhizobium*

alkalisoli sp. nov., isolated from *Caragana intermedia* growing in saline-alkaline soils in the north of China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 3006-3011.

Lu JK, Dou YJ, Zhu YJ, Wang SK, Sui XH, Kang LH. (2014). *Bradyrhizobium ganzhouense* sp. nov., effective symbiotic bacterium isolated from *Acacia melanoxylon* R. Br. Nodules. Int J Syst Bacteriol in press doi:10.1099/ijs.0.056564-0.

Maathuis FJM. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. Current Opinion in Plant Biology 12:250 258.

McCarthy TW, Der JP, Honaas LA, dePamphilis CW, Anderson CT. (2014). Phylogenetic analysis of pectin-related gene families in *Physcomitrella patens* and nine other plant species yields evolutionary insights into cell walls. BMC Plant Biol 14:79.

Madsen L, Tirichine L, Jurkiewicz A, Sullivan JT, Heckmann AB, Bek A, Ronson CW, James EK, and Stougaard J. (2010). The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. Nature Communications.DOI: 10.1038/ncomms1009.

Mantelin S. (2006). Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 56:827 839.

Mateos PF, Jimenez-Zurdo JI, Chen J, Squartini AS, Haack SK, Martinez-Molina E, Hubbell DH and Dazzo FB. (1992). Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. Appl Environ Microbiol 58:1816 1822.

Mateos PF, Baker B, Philip-Hollingsworth S, Squartini A, Peruffo A, Nuti M, 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 1995, 41:202 207.

Mateos PF, Baker D, Petersen M, Velázquez E, Jiménez-Zurdo JI, Martínez-Molina E, Squartini A, Orgambide G, Hubbell D, Dazzo FB. 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.

Mateos PF, Rivas R, Robledo M, Velázquez E, Martúnez-Molina E, Emerich DW. (2011). The Path of Rhizobia: From a Free-living Soil Bacterium to Root Nodulation. In: Ecological Aspects of Nitrogen Metabolism in Plants. Polacco/Ecological, John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, pp. 167 194.

Maria de Souza Moreira F, Cruz L, Miana de Faria S, Marsh T, Martínez-Romero E, de Oliveira Pedrosa F, et al. (2006). *Azorhizobium* doebereinerae sp. nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. Syst Appl Microbiol 29:197 206.

Martinez-Molina E, Morales V. (1979). Hydrolytic enzyme production by *Rhizobium*. Applied and Environmental Microbiology,Vol.38,No.6,p.1186-1188.

Martínez-Romero E, Segovia L, Mercante FM, Franco AA, Graham P, Pardo MA. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. Int J Syst Bacteriol 41:417 426.

Matthysse A., Thomas DL. and White AR. (1995). Mechanism of cellulose synthesis in *Agrobacterium tumafaciens*. J Bacteriol. 177, 4:1076-1081.

Masalha J, Kosegarten H, Elmaci X, Mengel K. (2000). The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. Biol Fertil Soils 30:433 439.

Meade HM, Long SR, Ruvkun GB, Brown SE, Ausubel FM. (1982). Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. J Bacteriol 149:114 122.

Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers JM. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. FEMS Microbiol. Rev. 37:634 663.

Merabet C., Martens M., Mahdhi M., Zakhia F., Sy A., Le Roux C., Domergue O., Coopman R., Bekki A., Mars M., Willems A. And De Lajudie P. (2010). Multilocus sequence analysis of root nodule isolates from *Lotus arabicus* Senegal, *Lotus creticus*, *Argyrolobium uniflorum* and *Medicago sativa* Tunisia and description of *Ensifer numidicus* sp. nov. and *Ensifer garamanticus* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 664-674.

Mesa S, Hauser F, Friberg E, Malagutti E, Fischer HM, Hennecke H. (2008). Comprehensive Assessment of the Regulons Controlled by the FixLJ-FixK2-FixK1 Cascade in *Bradyrhizobium japonicum*. Journal of Bacteriology 190:6568 6579.

Miller SH, Elliot RM, Sullivan JT, Ronson CW. (2007). Host-specific regulation of symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. Microbiology (Reading, Engl) 153:3184 3195

Mithöfer A. (2002). Suppression of plant defence in rhizobia-legume symbiosis. Trends in Plant Science 7:440 444.

Mitra R, Gleason C, Edwards A, James Hadfield, J. Allan Downie, Giles E. D. Oldroyd, and Sharon R. Long (2004). A Ca2+/calmodulin-dependent

protein kinase required for symbiotic nodule development: gene identification by transcript-based cloning. Proceedings of the National Academy of Sciences vol. 101. 13; 701 4705

Mølhøj M, Jørgensen B, Ulvskov P, Borkhardt B. (2001). Two *Arabidopsis thaliana* genes, KOR2 and KOR3, which encode membrane-anchored endo-1,4-beta-D-glucanases, are differentially expressed in developing leaf trichomes and their support cells. Plant Mol Biol 46:263 275.

Morales VM, Martinez-Molina E, Hubbell DH. (1984). Cellulase production by *Rhizobium* - Springer. Plant and Soil. 80, 407-415.

Moreira F.M.S., Cruz L., Faria S.M., Marsh T., Martínez-Romero E., Pedrosa F.O., Pitard R.M. and Young J.P.W. (2006). *Azorhizobium doebereinerae* sp. nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* Caz. Pers. Syst. Appl. Microbiol. 29:197-206.

Moreno MLO, Vélez DU. (2011). Nuevo método para la cuantificación de la actividad endoglucanasa basado en el complejo celulosa-rojo congo. Orinoquia 15:7 15.

Morgan JLW, Strumillo J, Zimmer J. (2012). Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. Nature 493:181 186.

Muñoz JA, Coronado C, Pérez-Hormaeche J, Kondorosi A, Ratet P, Palomares AJ. (1998). MsPG3, a *Medicago sativa* polygalacturonase gene expressed during the alfalfa *Rhizobium meliloti* interaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 95, pp. 9687 9692

Murray JD, Muni RRD, Torres-Jerez I, Tang Y, Allen S, Andriankaja M, et al. (2011). Vapyrin, a gene essential for intracellular progression of arbuscular mycorrhizal symbiosis, is also essential for infection by rhizobia in the nodule symbiosis of *Medicago truncatula*. Plant J 65:244 252.

Murray JD. (2011). Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. Mol Plant Microbe Interact 24:631 639.

Nandasena K.G., O'hara G.W., Tiwari R.P., Willems A. And Howieson J.G. (2009). *Mesorhizobium australicum* sp. nov. and *Mesorhizobium opportunistum* sp. nov., isolated from *Biserrula pelecinus* L. in Australia. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 2140-2147.

Nicol F, His I, Jauneau A, Vernhettes S, Canut H, Höfte 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, Kapp D, Puhler A. (1993). Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. Planta 190:415 425.

Nishimura C, Ohashi Y, Sato S, Kato T, Tabata S, Ueguchi C. (2004). Histidine Kinase Homologs That Act as Cytokinin Receptors Possess Overlapping Functions in the Regulation of Shoot and Root Growth in Arabidopsis.

Nobles DR, Romanovicz DK, Brown RM. (2001). Cellulose in cyanobacteria. Origin of vascular plant cellulose synthase? Plant Physiol 127:529 542.

Nobles DR, Brown RM. (2004). The pivotal role of cyanobacteria in the evolution of cellulose synthases and cellulose synthase-like proteins. Cellulose 11:437 448.

Nutman, P. S. (1956). The influence of the legume in root nodule symbiosis. A comparative study of host determinants and functions. Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.31:109-151.

O'Gara, F. y Shanmugam, K. T. (1976). Regulation of nitrogen fixation by Rhizobia. Export of fixed N_2 as NH_4. Biochim Biophys Acta 437, 313-321.

Oldroyd GE, Engstrom EM, Long SR. (2001). Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. The Plant Cell 13:1835 1849.

Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA. (2011). The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. Annu Rev Genet 45:119 144.

Oldroyd GED. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. Nature Reviews Microbiology 11:252 263.

Op den Camp R, Streng A, De Mita S, Cao Q, Polone E, Liu W, Ammiraju JSS, Kudrna D, Wing R, Untergasser A, Bisseling T, and Geurts R. (2011). LysM-type mycorrhizal receptor recruited for *Rhizobium* symbiosis in nonlegume *Parasponia*. Science 331:909 912.

Panday D., Schumann P. and Das S.K. (2011). *Rhizobium pusense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of chickpea *Cicer arietinum* L.. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:2632-2639.

Park YW, Tominaga R, Sugiyama J, Furuta Y, Tanimoto E, Samejima M, et al. (2003). Enhancement of growth by expression of poplar cellulase in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 33:1099 1106.

Pear JR, Kawagoe Y, Schreckengost WE, Delmer DP, Stalker DM. (1996). Higher plants contain homologs of the bacterial *celA* genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase. Proc Natl Acad Sci USA 93:12637 12642.

Pellock, B.J., Cheng, H.P. & Walker, G.C. (2000) Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. J. Bacteriol. 182, 4310 4318.

Peng L., Kawagoe Y., Hogan P., Delmer D. (2002). Sitosterol-beta-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. Science 295:147 150.

Peng G., Yuan Q., Li H., Zhang W. and Tan Z. (2008). *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 2158-2163.

Perret X, Staehelin C, Broughton WJ. (2000). Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000, 64(1):180

Pueppke SG, Broughton WJ. (1999). *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. Mol Plant Microbe Interact 12:293 318.

Puławska J., Willems A., De Meyer S.E. and Süle S. (2012). *Rhizobium nepotum* sp. nov. isolated from tumors on different plant species. Syst. Appl. Microbiol. 35: 215-220.

Puławska J., Willems A. And Sobiczewski P. (2012). *Rhizobium skierniewicense* sp. nov., isolated from tumours on chrysanthemum and cherry plum. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62: 895-899.

Pumplin N, Mondo SJ, Topp S, Starker CG, Gantt JS, Harrison MJ. (2010). *Medicago truncatula* Vapyrin is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis. Plant J 61:482 494.

Quan ZX. (2005). *Rhizobium daejeonense* sp. nov. isolated from a cyanide treatment bioreactor. Int J Syst Evol Microbiol 55:2543 2549.

Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Grønlund M, et al. (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. Nature 425:585 592.

Rae AL, Bonfante-Fasolo P, Brewin NJ. (1992). Structure and growth of infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. Plant J 2:385 395.

Ramírez-Bahena, M.H., García-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J.M., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Velázquez, E. (2008) Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889, *R. phaseoli* Dangeard 1926AL and *R. trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *Rhizobium leguminosarum* DSM 30132T (=NCIMB 11478T) into the new species *Rhizobium pisi* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 58, 2484-2490.

Ramírez-Bahena M.H., Peix A., Rivas R., Camacho M., Rodríguez-Navarro D.N., Mateos P.F., Martínez-Molina E., Willems A. And Velázquez E. (2009). *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 1929-1934.

Ramírez-Bahena, M.H, Chahboune R, Peix A and Velazquez E. (2013). Reclassification of *Agromonas oligotrophica* into the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium oligotrophicum* comb nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2013), 63, 1013–1016.

Rasolomampianina R., Bailly X., Fetiarison R. (2005). Nitrogen-fixing nodules from rose wood legume trees *Dalbergia* spp. endemic to Madagascar host seven different genera belonging to alpha- and beta-Proteobacteria. Mol Ecol. 14:4135–46.

Ren D.W., Chen W.F., Sui X.H., Wang E.T. and Chen W.X. (2011). *Rhizobium vignae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from multiple legume species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 580-586.

Ren D.W., Wang E.T., Chen W.F., Sui X.H., Zhang X.X., Liu H.C. And Chen W.X. (2011). *Rhizobium herbae* sp. nov. and *Rhizobium giardinii*-related bacteria, minor microsymbionts of various wild legumes in China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 1912-1920.

Reeve W, O'Hara G, Chain P, Ardley J, Bräu L, Nandesena K, Tiwari R, Copeland A, Nolan M, Han C, Brettin T, Land M, Ovchinikova G, Ivanova N, Mavromatis K, Markowitz V, Kyrpides N, Melino V, Denton M, Yates R, and Howieson J. (2010). Complete genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii strain WSM1325, an effective microsymbiont of annual Mediterranean clovers. 2:347–356.

Reeve W, Chain P, O'Hara G, Ardley J, Nandesena K, Bräu L, Tiwari R, Malfatti S, Kiss H, Lapidus A, Copeland A, Nolan M, Land M, Hauser L, Chang YJ, Ivanova N, Mavromatis K, Markowitz V, Kyrpides N, Gollagher M, Yates R, Dilworth M, and Howieson J. (2010). Complete genome sequence of the *Medicago* microsymbiont *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *medicae* strain WSM419. 2:77–86.

Rey T, Nars A, Bonhomme M, Bottin A, Huguet S, Balzergue S, et al. (2013). NFP, a LysM protein controlling Nod factor perception, also intervenes in *Medicago truncatula* resistance to pathogens. New Phytologist 198:875–886.

Reyes-Gaige A, Ayella A, Shuai B. (2010). Methyl jasmonate and ethylene induce partial resistance in *Medicago truncatula* against the charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. Physiological and Molecular Plant Pathology 1–7.

Ribeiro R.A., Rogel M.A., López-López A., Ormeño-Orrillo E., Barcellos F.G., Martínez J., Thompson F.L., Martínez-Romero E. and Hungria M. (2012). Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., , 62, 1179-1184

Riely BK, Lougnon G, Ané J-M, Cook DR. (2006). The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots. The Plant Journal 49:208 216.

Rincón-Rosales R., Lloret L., Ponce E. and Martínez-Romero E. (2008). Rhizobia with different symbiotic efficiencies nodulate *Acaciella angustissima* in Mexico, including *Sinorhizobium chiapanecum* sp. nov. which has common symbiotic genes with *Sinorhizobium mexicanum*. FEMS Microbiol Ecol 67:103 117.

Rincon-Rosales R, Villalobos-Escobedo JM, Rogel MA, Martinez J, Ormeño-Orrillo E and Martinez-Romero E. (2013). *Rhizobium calliandrae* sp. nov., *Rhizobium mayense* sp. nov. and *Rhizobium jaguaris* sp. nov., rhizobial species nodulating the medicinal legume *Calliandra grandiflora. IJSEM*

Rivas R., Velazquez E., Willems A., Vizcaíno N., Subba-Rao NS., Mateos PF., Gillis M., Dazzo FB. and Martinez-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.

Rivera LP. (2013). Análisis funcional de la celulasa CelC2 en la interacción mutualista de *Rhizobium* en cereales, leguminosas y solanáceas. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.

Roberts AW., Roberts EM and Delmer DP (2002). Cellulose synthase (CesA) genes in the green alga *Mesotaenium caldariorum*. 1:847 855.

Robledo, M., Jiménez-Zurdo, J.I., Velázquez, E., Trujillo, M.E., Zurdo-Piñeiro, J.L., Ramírez- Bahena, M.H., Ramos, B., Díaz-Mínguez, J.M., Dazzo, F., Martínez-Molina, E., Mateos, P.F. 2008. *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 105: 7064-7069.

Robledo M. (2010). Análisis molecular y funcional de la celulase CelC2 en la simbiosis Rhizobia-leguminosas. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.

Robledo M, Jiménez-Zurdo JI, Soto MJ, Velázquez E, Dazzo F, Martínez-Molina E, Mateos PF. (2011). Development of functional symbiotic white clover root hairs and nodules requires tightly regulated production of rhizobial cellulase CelC2. Mol Plant Microbe Interact 24:798 807.

Robledo M, Rivera LP, Jiménez-Zurdo JI, Rivas R, Dazzo FB, Velázquez E, Martínez-Molina E, Hirsch AM, Mateos PF. (2012). Role of *Rhizobium*

endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. Microb. Cell Fact. 11:125.

Roche, P., Debeilb, F., Maillet, F., Lerouge, I., Faucher,C ,Truchet, G., Dbnarib,J., andPromb,J.C. (1991). Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. Cell 67, 1131-1143.

Rodríguez-Llorente ID, Pérez-Hormaeche J, Dary M, Caviedes MA, Kondorosi A, Ratet P, et al. (2003). Expression of MsPG3-GFP fusions in *Medicago truncatula* 'hairy roots' reveals preferential tip localization of the protein in root hairs. Eur J Biochem 270:261 269.

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.

Rolfe, B.G., Carlson R.W., Ridge R.W., Dazzo F.B., Mateos P.F., Pankhurst C.E. (1996). Defective infection and nodulation of clovers by exopolysaccharide mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. Functional Plant Biology 23: 285-303.

Rome S, Fernandez MP, Brunel B, Normand P, Cleyet-Marel JC. (1996). *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago spp*. Int J Syst Bacteriol 46:972 980.

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., Benziman, M. (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. Nature 325 (6101):279-281.

Ross PP, Mayer RR, Benziman MM. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. Microbiol Rev 55:35 58.

Rujan T, Martin W. (2001). How many genes in *Arabidopsis* come from cyanobacteria? An estimate from 386 protein phylogenies. Trends Genet 17:113 120.

Saïdi S, Ramírez-Bahena MH, Santillana N, Zúñiga D, Álvarez-Martínez E, Peix A, Mhamdi R, Velázquez E. (2013). *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* in several continents. IJSEM

Sambrook, J., Fritsch,E.J. & Maniatis,T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY).

Santillana N, Arellano C, Zúñiga D. (2005) PGPR Capacity of *Rhizobium* on *Lycopersicon esculentum* Miller. (tomato). Ecología Aplicada, 4(1,2).

Santos R, Hérouart D, Sigaud S, Touati D, Puppo A. (2001). Oxidative burst

in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. Mol Plant Microbe Interact 14:86 89.

Sato S, Kato T, Kakegawa K, Ishii T, Liu YG, Awano T, et al. (2001). Role of the putative membrane-bound endo-1,4-beta-glucanase KORRIGAN in cell elongation and cellulose synthesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol 42:251 263.

Saxena IM, Brown RM Jr, Fevre M, Geremia RA, Henrissat B. (1995). Multidomain architecture of beta-glycosyl transferases: implications for mechanism of action. J Bacteriol 177:1419.

Scheidle H, Gross A, Niehaus K. (2005). The Lipid A substructure of the *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides is sufficient to suppress the oxidative burst in host plants. New Phytol 165:559 565.

Schmeisser C, Liesegang H, Krysciak D. (2009). *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. App Environ Microbiol.

Schultze M, Kondorosi A. (1998) Regulation of symbiotic root nodule development. Annu Rev Genet. 1998;32:33-57.

Segovia L, Young JP, Martínez-Romero E. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 43:374 377.

Shani, Z., Dekel, M., Tzbary, G., Jensen, C.S., Tz®ra, T., Goren, R., Altman, A. and Shoseyov, O. (1999) Expression of *Arabidopsis thaliana* endo-1,4-b-glucanase (cel1) in transgenic plants. In Plant Biotechnology and in vitro Biology in the 21st Century (Altman, A., Ziv, M. and Izhar, S., eds), Dordrecht, the Nether- lands: Kluwer Academic Publishers, pp. 209-212.

Sheu SY, Chou JH, Bontemps C, Elliot GN, Gross E, James EK, Sprent JI, Young PW and Chen WM. (2012). *Burkholderia symbiotica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa spp*. native to north-east Brazil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62, 2272 2278.

Sheu SY, Chou JH, Bontemps C, Elliot GN, Gross E, Dos Reis Junior FB, Melkonian R, Moulin L, James EK, Sprent JI, Young PW and Chen WM. (2013). *Burkholderia diazotrophica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa spp*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2013), 63, 435 441.

Sieberer BJ, Chabaud M, Timmers AC, Monin A, Fournier J, Barker DG. (2009). A nuclear-targeted cameleon demonstrates intranuclear Ca2+ spiking in *Medicago truncatula* root hairs in response to rhizobial nodulation factors. Plant Physiol 151:1197 1206.

Silva FV, De Meyer SE, Simões-Araújo JL, da Costa Barbé T, Xavier GR,

O'Hara G, Ardley JK, Rumjanek NG, Willems A and Zilli JE. (2014). *Bradyrhizobium manausense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vigna unguiculata* grown in Brazilian Amazon rainforest soils. IJSEM in press. Doi:10.1099/ijs.0.061259-0.

Smit G, Kijne JW, Lugtenberg BJ. (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 P, Raedts J, Portyanko V, Debellé F, Gough C, Bisseling T, and Geurts R. (2005). NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. 308:1789 1791.

Spaink HP. (2000) Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. Annu Rev Microbiol, 54:257-88.

Sprent JI. (2007). Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. New Phytologist 174:11 25.

Sprent J. (2009). Legume nodulation. Wiley Online Library.

Squartini A., Struffi P., Döring H., Selenska-Pobell S., Tola E., Giacomini A., Vendramin E., Velázquez E., Mateos P.F., Martínez-Molina E., Dazzo F.B., Casella S. And Nuti M.P. (2002). *Rhizobium sullae* sp. nov. formerly '*Rhizobium hedysari*', the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 1267-1276.

Skorupska A, Białek U, Urbanik-Sypniewska T, van Lammeren A. (1995) Two types of nodules induced on *Trifolium pratense* by mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii deficient in exopolysaccharide production. J Plant Physiol, 147:93-100.

Skorupska A, Janczarek M, Marczak M, Mazur A, Król J. (2006). Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. Microb Cell Fact 5:7.

Stracke S, Kistner C, Yoshida S, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J, Szczyglowski K and Parniske M. (2002). A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. Nature 417:959 962.

Steel RGD, Torrie JH (1980) Principles and procedures of statistics a biometrical approach, 2nd edn. McGraw-Hill, New York.

Solovyev V and Salamov A. (2011). Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences, p 61 78. In Li RW (ed), Metagenomics and its applications in agriculture, biomedicine and environmental studies.

Nova Science Publishers, Hauppauge, NY.

Svistoonoff S, Hocher V, Gherbi H. (2014). Actinorhizal root nodule symbioses: what is signalling telling on the origins of nodulation? Current Opinion in Plant Biology 20C:11 18.

Swanson JA, Mulligan JT, Long SR. (1993). Regulation of syrM and nodD3 in *Rhizobium meliloti*. Genetics 134:435 444.

Taga ME, Walker GC. (2010). *Sinorhizobium meliloti* requires a cobalamin-dependent ribonucleotide reductase for symbiosis with its plant host. Mol Plant Microbe Interact 23:1643 1654.

Takahashi J, Rudsander UJ, Hedenstrom M, Banasiak A, Harholt J, Amelot N, et al. (2009). KORRIGAN1 and its Aspen Homolog PttCel9A1 Decrease Cellulose Crystallinity in *Arabidopsis* Stems. Plant Cell Physiol 50:1099 1115.

Tan ZY, Kan FL, Peng GX, Wang ET, Reinhold-Hurek B, Chen WX. (2001). *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. Int J Syst Bacteriol 51:909 914.

Taubert PHW. (1894). Leguminosae.

Taylor NG, Scheible WR, Cutler S, Somerville CR, Turner SR. (1999). The irregular xylem3 locus of *Arabidopsis* encodes a cellulose synthase required for secondary cell wall synthesis. The Plant Cell … 11:769 780.

Teeri TH, Lehväslaiho H, Franck M, Uotila J, Heino P, Palva ET, et al. (1989). Gene fusions to lacZ reveal new expression patterns of chimeric genes in transgenic plants. EMBO J. 8:343 350.

Terpolilli JJ, O'Hara GW, Tiwari RP, Dilworth MJ, Howieson JG. (2008). The model legume *Medicago truncatula* A17 is poorly matched for N2 fixation with the sequenced microsymbiont *Sinorhizobium meliloti* 1021. New Phytol 179:62 66.

Tian C.F., Wang E.T., Wu L.J., Han T.X., Chen W.F., Gu C.T., Gu J.G. and Chen W.X. (2008). *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 2871-2875.

Timmers AC, Auriac MC, de Billy F, Truchet G. (1998). Nod factor internalization and microtubular cytoskeleton changes occur concomitantly during nodule differentiation in alfalfa. Development 125:339 349.

Timmers AC, Auriac MC, Truchet G. (1999). Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. Development.126, 3617-3628

Tobisch S, Glaser P, Krüger S, Hecker M. (1997). Identification and characterization of a new beta-glucoside utilization system in *Bacillus subtilis*. J

Bacteriol.

Toledo I, Lloret L, Martínez-Romero E. (2003). *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a New *Sinorhizobium* Species Nodulating Native *Acacia spp*. in Mexico. Syst Appl Microbiol 26:54 64.

Trujillo ME., Willems A., Abril A., Planchuelo AM., Rivas R., Ludeña D., Mateos PF., Martinez-Molina E. and Velazquez E. (2005). Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. Appl Environ Microbiol 71:1318 1327.

Unno Y, Shinano T. (2013). Metagenomic Analysis of the Rhizosphere Soil Microbiome with Respect to Phytic Acid Utilization. Microb. Environ. 28:120 127.

Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Research 40(15):e115.

Valverde A. (2003). *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. Int J Syst Evol Microbiol 53:1979 1983.

Valverde A. (2005). *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. Int J Syst Evol Microbiol 55:1985 1989.

Valverde A, Igual JM, Peix A, Cervantes E, Velazquez 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 TA, Eardly BD. (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 Berkum P., Leibold J.M. And Eardly B.D. (2006). Proposal for combining *Bradyrhizobium spp*. *Aeschynomene indica* with *Blastobacter* denitrificans and to transfer *Blastobacter denitrificans* Hirsh and Muller, 1985 to the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium denitrificans* comb. nov.. Syst. Appl. Microbiol. 29: 207-215.

van Brussel AA, Bakhuizen R, van Spronsen PC, Spaink HP, Tak T, Lugtenberg BJ, Kijne JW. (1992) Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*.Science. 3;257(5066):70-2.

Van de Velde W, Grigor Zehirov, Agnes Szatmari, Monika Debreczeny, Hironobu Ishihara, Zoltan Kevei, Attila Farkas, Kata Mikulass, Andrea Nagy, Hilda Tiricz, Beatrice Satiat-Jeunemaître, Benoit Alunni, Mickael

Bourge, Ken-ichi Kucho, Mikiko Abe, Attila Kereszt, Gergely Maroti, Toshiki Uchiumi, Eva Kondorosi, and Peter Mergaert. (2010). Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. 327:1122 1126.

Vance CP. (1983) *Rhizobium* Infection and Nodulation: A Beneficial Plant Disease? Annual Review of Microbiology Vol. 37: 399-424

Vandamme P., Coenye T. (2004). Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. Int J Syst Evol Microbiol 54:2285 2289.

van Spronsen PC, Bakhuizen R, van Brussel AA, Kijne JW. (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(1):88-94.

Vasse J, de Billy F, Camut S, Truchet G. (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. J Bacteriol 172:4295 4306.

Veereshlingam H, Haynes JG, Penmetsa RV, Cook DR, Sherrier DJ, Dickstein R. (2004). *nip*, a symbiotic *Medicago truncatula* mutant that forms root nodules with aberrant infection threads and plant defense-like response. Plant Physiol 136:3692 3702.

Velazquez E, Igual JM, Willems A, Fern MP, Mu E, Mateos PF, et al. (2001). *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). Int J Syst Evol Microbiol 51:1011 1021.

Vidal C., Chantreuil C., Berge O., Mauré L., Escarré J., Béna G., Brunel B. And Cleyet-Marel J.C. (2009). *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metallicolous soil in Languedoc, France. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 850-855.

Vincent JM (1970) A manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific, Oxford.

Vinuesa P. (2005). *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. Int J Syst Evol Microbiol 55:569 575.

VVAA (2013). Feed The World. 1 36.

Waffenschmidt S. and Jaenicke L. (1987). ScienceDirect.com - Analytical Biochemistry - Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2,2′-bicinchoninate. Anal Biochem.

Wang ET, van Berkum P, Beyene D, Sui XH, Dorado O, Chen WX, et al.

(1998). *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. Int J Syst Bacteriol 48 Pt 3:687 699.

Wang, E., Rogel, M., García-de-los-Santos, A., Martínez-Romero, J., Cevallos, M., and Martínez-Romero, E. (1999). *Rhizobium etli* bv. mimosae, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. International Journal of Systematic Bacteriology 49: 1497-1491..

Wang E, Rogel A, Sui X, Chen W, Martinez-Romero E, van Berkum P. (2002). *Mesorhizobium amorphae*, a rhizobial species that nodulates *Amorpha fruticosa* , is native to American soils. Arch Microbiol 178:301 305.

Wang D, Griffitts J, Starker C, Fedorova E, Limpens E, Ivanov S, Bisseling T and Long SR. (2010). A nodule-specific protein secretory pathway required for nitrogen-fixing symbiosis. Science 327:1126 1129.

Wang F, Wang ET, Wu LJ, Sui XH,1 Ying Li Jr and Chen WX. (2011). *Rhizobium vallis* sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61, 2582 2588.

Wang R, Chang YL, Zheng WT, Zhang D, Zhang XX, Sui XH, Wang ET, Hu LQ, Zhang LY and Chen XW. (2012). *Bradyrhizobium arachidis* sp. nov., isolated from effective nodules of *Arachis hypogaea* grown in China. Systematic and Applied Microbiology 36 (2013) 101 105.

Wang JY, Wang R, Zhang YM, Liu HC, Chen WF, Wang ET, Sui XH and Chen WX. (2012). *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov. isolated from nodules of soybean grown in Daqing City of China. IJSEM

Weerasinghe RR, Collings DA, Johannes E, Allen NSM. (2003). The distributional changes and role of microtubules in Nod factor-challenged *Medicago sativa* root hairs. Planta 218:276 287.

Wei GH. (2002). *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera spp*. and *Kummerowia stipulacea*. Int J Syst Evol Microbiol 52:2231 2239.

Wei G.H., Tan Z.Y., Zhu M.E., Wang E.T., Han S.Z. and 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.

Wen Y, Zhang J, Yan Q, Li S, Hong Q. (2011). *Rhizobium phenanthrenilyticum* sp. nov., a novel phenanthrene-degrading bacterium isolated from a petroleum residue treatment system. J. Gen. Appl. Microbiol. 57:319 329.

Weyens N, van der Lelie D, Taghavi S, Newman L, Vangronsveld J. (2009). Exploiting plant microbe partnerships to improve biomass production and remediation. Trends in Biotechnology 27:591 598.

Wielbo J, Mazur A, Krol J, Marczak M, Kutkowska J, Skorupska A. (2004) Complexity of phenotypes and symbiotic behaviour of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii exopolysaccharide mutants. Arch Microbiol 182:331-336.

Williams A, Wilkinson A, Krehenbrink M. (2008). Glucomannan-mediated attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs is required for competitive nodule infection. Journal of Bacteriology, Vol. 190, No. 13 p. 4706 4715

Wisniewski-Dyé F, Borziak K, Khalsa-Moyers G, Alexandre G, Sukharnikov LO, Wuichet K, et al. (2011). *Azospirillum* Genomes Reveal Transition of Bacteria from Aquatic to Terrestrial Environments Richardson, PM (ed). PLoS Genet 7:e1002430.

Wong HC, Fear AL, Calhoon RD, Eichinger GH, Mayer R, Amikam D, et al. (1990). Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. Proc Natl Acad Sci USA 87:8130 8134.

Xie F, Murray JD, Kim J, Heckmann AB, Edwards A, Oldroyd GED, Downie JA. (2012). Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. Proc Natl Acad Sci USA 109:633 638.

Xu LM, Ge C, Cui Z, Li J, Fan H. (1995). *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. Int J Syst Bacteriol 45:706 711.

Yanni YG, Rizk Rizk Y., El-Fattah Faiza KA, Squartini A, Corich V, Giacomini A, de Bruijn F, Rademaker J, Maya-Flores J, Ostrom P, Vega-Hernandez M, Hollingsworth RI, Martinez-Molina E, Mateos PF, Velazquez E, Wopereis J, Triplett E, Umali-Garcia M, Anarna JA., Rolfe BG., Ladha JK., Hill J, Mujoo R, Ng Perry K., Dazzo FB. (2001) The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii with rice roots. Australian Journal of Plant Physiology 28 , 845 870.

Yao ZY. (2002). Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 52:2219 2230.

Yao L.J., Shen Y.Y., Zhan J.P., Xu W., Cui G.L. and Wei G.H. (2012). *Rhizobium taibaishanense* sp. nov., isolated from a root nodule of *Kummerowia striata*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62: 335-341.

Yendrek CR, Lee Y-C, Morris V, Liang Y, Pislariu CI, Burkart G, et al. (2010). A putative transporter is essential for integrating nutrient and hormone signaling with lateral root growth and nodule development in *Medicago*

truncatula. Plant J 62:100 112.

Yoon J.H., Kang S.J., Yi H.S., Oh T.K. and Ryu C.M. (2010). *Rhizobium soli* sp. nov., isolated from soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 1387-1393.

Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martínez-Romero, E., Kerr, A., Sawada, H. A (2001) 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 JM. (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. (2004). Renaming of *Agrobacterium larrymoorei* Bouzar and Jones 2001 as *Rhizobium larrymoorei* Bouzar and Jones 2001 comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 149.

Young J, Crossman L, Johnston A, Thomson NR, Ghazoui ZF, Hull KH,, Wexler M, Curson ARJ, Todd JD, Poole PS,, Mauchline TH,, East AK, Quail MA, Churcher C, Arrowsmith C, Cherevach I, Chillingworth T, Clarke K, Cronin A, Davis P, Fraser A, Hance Z, Hauser H, Jagels K, Moule S, Mungall K, Norbertczak H, Rabbinowitsch E, Sanders M, Simmonds M, Whitehead S and Parkhill J. (2006). The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. Genome Biology, 7:R34

Young, JM. (2010) *Sinorhizobium* versus *Ensifer*: may a taxonomy subcommittee of the ICSP contradict the Judicial Commission?Int J Syst Evol Microbiol 60:1711 1713.

Young ND, Debelle F, Oldroyd GED, Geurts R, Cannon SB, Udvardi MK, Benedito VA., Mayer KFX., Gouzy J., Schoof H., Van de Peer Y., Proost S., Cook DR., Meyers BC., Spannagl M., Cheung F., De Mita S., Krishnakumar V., Gundlach H., Zhou S., Mudge J., Bharti AK., Murray JD., Naoumkina MA., Rosen B., Silverstein KAT., Tang H., Rombauts S., Zhao PX, Zhou P, Barbe V, Bardou P, Bechner M, Bellec A, Berger A., Bergès H, Bidwell S, Bisseling T, Choisne N, Couloux A, Denny R., Deshpande S, Dai X, Doyle JJ, Dudez A-M, Farmer AD, Fouteau S., Franken C, Gibelin C, Gish J, Goldstein S, González AJ, Green PJ., Hallab A, Hartog M, Hua A, Humphray SJ, Jeong D-H, Jing Y, Jöcker A., Kenton SM, Kim D-J, Klee K, Lai H, Lang C, Lin S, Macmil SL., Magdelenat G, Matthews L, McCorrison J, Monaghan EL, Mun J-H., Najar FZ, Nicholson C, Noirot C, O'Bleness M, Paule CR, Poulain J., Prion F, Qin B, Qu C, Retzel EF, Riddle C, Sallet E, Samain S, Samson N., Sanders I, Saurat O, Scarpelli C, Schiex T, Segurens

B, Severin AJ., Sherrier DJ, Shi R, Sims S, Singer SR, Sinharoy S, Sterck L, Viollet A, Wang B-B, Wang K, Wang M, Wang X, Warfsmann J, Weissenbach J, White DD, White JD, Wiley GB, Wincker P, Xing Y, Yang L, Yao Z., Ying F, Zhai J, Zhou L, Zuber A, Dénarié J, Dixon RA, May GD, Schwartz DC, Rogers J, Quétier F., Town CD., Roe BA. (2011). The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. Nature. 480 pp 520-524

Zabetakis I. (1997). Enhancement of flavour biosynthesis from strawberry (*Fragaria* x *ananassa*) callus cultures by *Methylobacterium* species. Plant cell, tissue and organ culture 50:179 183.

Zhang R.J., Hou B.C., Wang E.T., Li Jr. Y., Zhang X.X. and Chen W.X. (2011). *Rhizobium tubonense* sp. nov., isolated from root nodules of *Oxytropis glabra*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 512-517.

Zhang G.X., Ren S.Z., Xu M.Y., Zeng G.Q., Luo H.D., Chen J.L., Tan Z.Y. and Sun G.P. (2011). *Rhizobium borbori* sp. nov., aniline-degrading bacteria isolated from activated sludge. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 816-822.

Zhang X., Sun L., Ma X., Sui X.H. and Jiang R. (2011). *Rhizobium pseudoryzae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of rice. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 2425-2429.

Zhang Y.M., Li Y.J., Chen W.F., Wang E.T., Sui X.H., Li Q.Q., Zhang Y.Z., Zhou Y.G. and Chen W.X. (2012). *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from soybean *Glycine max* L. nodules. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62: 1951-1957.

Zhang X., Li B., Wang H., Sui X., Ma X., Hong Q. And Jiang R. (2012). *Rhizobium petrolearium* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62: 1871-1876.

Zhao C.T., Wang E.T., Zhang Y.M., Chen W.F., Sui X.H., Chen W.X., Liu H.C. and Zhang X.X. (2012). *Mesorhizobium silamurunense* sp. nov., isolated from root nodules of *Astragalus* species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62: 2180-2186.

Zheng WT, Li Y, Wang JR, Sui XH, Zhang XX, Zhang JJ, Wang ET and Chen WS. (2013). *Mesorhizobium qingshengii* sp. nov., isolated from effective nodules of *Astragalus sinicus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63, 2002 2007

Zhou PF, Chen WM and Wei GH. (2010). *Mesorhizobium robiniae* sp. nov., isolated from root nodules of *Robinia pseudoacacia*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, 2552 2556

Zhou S, Li Q, Jiang H, Linstrom K and Zhang X. (2013). *Mesorhizobium sangaii* sp nov. isolated from the root nodules of *Astragalus luteolus* and

Astragalus ernestii. IJSEM

Zuo J, Niu QW, Nishizawa N, Wu Y, Kost B, Chua NH. (2000). KORRIGAN, an *Arabidopsis* endo-1,4-beta-glucanase, localizes to the cell plate by polarized targeting and is essential for cytokinesis. The Plant Cell 12:1137 1152.

Zurdo-Pineiro JL, Rivas R, Trujillo ME, Vizcaíno N, Carrasco JA, Chamber M, et al. (2007). *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. Int J Syst Evol Microbiol 57:784 788.

SUMMARY (EN)

Introduction

The exponential worldwide population increase in the last decades due to the demographic growth in non-developed countries is a motive to concern. Great famines and undernourishment, especially in children are reaching an alarming extent. In this global scenario, crop production, previously increased with last century agrarian improvements, is not enough. According to FAO, a 50% decrease of arable or agricultural land had happened in 2013.

Chemical fertilizers have produces several environmental and health issues, modifying biogeochemical cycles, such as nitrogen and phophorous cycle, adversely affecting human and animal health, biodiversity and generating water eutrophication (Cowling *et al.,* 2001; Erisman *et al.,* 2011).

One of the proposed alternatives is the use of benefitial microbes-based biofertilizers. Use of those microbial-based biofertilizers is supported by international, national and regional directives and guidelines which promote nitrate-based fertilizer reduction and the use of organic fertilizers for boosting sustainable agriculture and decrease greenhouse gasses release and minimize environmental and health problematic.

Microbes can establish mutualistic interactions with plants, contributing to plant survival. Microbes are crucial for nutrient assimilation, relay pathogen and stress resistance, improve plant development and also, diazotrophs contribute to atmospheric Nitrogen fixation in plants. These beneficial relationships are well-studied by scientific community, whom has as main goal to optimize those symbiotic interactions, looking for better adequation to environment and improving the development of multifunctional biofertilizers.

Among those microbes, the genus *Rhizobium* and its interactions with legumes has been the most studied symbiotic relationships, although in last decade, it has been proposed also as PGPR inoculant in several crops such as cereals and vegetables (Yanni *et al*., 2001; Flores-Félix *et al*., 2013). The establishment of an efficient rhizobia-legume symbiosis demand of a complex and extremely regulated infection process, followed by nodule development and Nitrogen Fixation (Oldroyd *et al.,* 2011). The establishment and the infection process steps depend of the host legume, cause both, plant and rhizobia, must be compatible.

Our research group demostrate the existence of a cellulase, identified in *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii ANU843, called CelC2, essential in primary infection in its host plant *Trifolium repens* (Robledo *et al*., 2008) and which is strictly regulated (Robledo *et al*., 2011a). Moreover, an aditional role is proposed for CelC2. This ß(1, 4)D-endoglucanase is involved in cellulose biosynthesis. Knockout and overproducing mutant strains show different behaviour in biofilm formation, roots and abiotic surfaces colonization (Robledo *et al.,* 2012). Besides, cellulase CelC2 expression in other *Rhizobium*

strains, such as the rice PGPR E11 strain (Yanni *et al*., 2001), demostrate similar effects in surface colonization and in its host legume infection process (Rivera TD, 2013).

CelC2 homologies *in silico* analysis

CelC2 cellulase has homologs in several genera of the Rhizobiaceae taxon, such as in the genus *Ensifer*, in which some species with sequenced genomes have 70% similar *celC* genes. One of those is *E. medicae* WSM419, the proper *Medicago truncatula* endosymbiont. CelC2 implications in *Trifolium repens* have been tested in our laboratory, showing the effects described before. Nevertheless, neither of them, plant nor rhizobia, are model organisms, so these interactions cannot be studied in-depth cause of the lack of molecular tools. However, few is known about cellulase functions in other symbiotic interactions, such as model symbiosis *Ensifer – Medicago*.

First, we developed a complete *in silico* analysis of the possible similarities of cellulose synthesis among *rhizobia.* The *celABC* operon is present in *rhizobia* and other related plant symbionts, such as *Rhizobium*, *Ensifer*, *Bacillus*, *Methylobacterium* or *Azospirillum*, among others, as described by several authors (Mathysse *et al.,* 1995; Robledo et al., 2012). In this work, we have focussed in the similiarities found in the genus *Ensifer* (table 1)

Table 1. Species among the genus *Ensifer* with rhizobial *celABC* operon similarities at nucleotide sequence level.

Specie	Operon genes	Protein domain	Genome localization	% protein similitude
E. fredii USDA257	bcsA/celB/USDA257_c11960	PF13642/PF07238-PF03170-PF01270	Cromosome	78%/48%/58%
E. fredii NGR234	celA/celB/celC	PF13642/PF07238-PF03170-PF01270	Plasmid (pNGR234b)	78%/48%/57%
E. fredii HH103	celC/celB/celA (antisentido)	PF13642/PF07238-PF03170-PF01270	Plasmid (pSfHH103e)	79%/48%/57%
E. medicae WSM419	Smed_5208/Smed_5209/Smed_5210	PF13642/PF07238-PF03170-PF01270	Plasmid (pSMED02)	77%/45%/58%
E. meliloti GR4	C770_GR4pC1240/C770_GR4pC1241/C770_GR4pC1242 (antisentido)	PF13642/PF07238-PF03170-PF01270	Plasmid (pRmGR4c)	76%/45%/58%
Ensifer sp. BR816	celA/celB/celC	PF13642/PF07238-PF03170-PF01270	Non determined (draft genome)	78%/48%/58%
E. adhaerens OV14	celA/celB/celC	PF13642/PF07238-PF03170-PF01270	Cromosome (cromosome 1)	77%/49%/59%

Therefore, *E. medicae* WSM419 shows 70% similitude to nucleotide sequence of *celC* gene regarding to *R. leguminosarum* bv trifolii ANU843 *celC* gene. Data show that *E. medicae* WSM419 habours *celABC* located in the symbiotic plasmid pSEMD02 and also, has *celIJK* operon, which probably is also involved in cellulose biosynthesis, but is located in the cromosome. *celIJK*

operon was found mainly in the cromosome of *E. meliloti* (strains 1021, SM11, BL225C). We have found that an *E. meliloti* strain (GR4) harbours *celABC* operon.

CelC2 implications in colonization *in vitro*.

Due to the importance of *celABC* operon in the cellulose biosynthesis and the insights about CelC2 cellulase described by our research group, we decided to caracterize *celC*- expressing strains and then, test its ability *in vitro* for cellulose production and biofilm formation. CelC2 does not affect *in vitro* colonization and also, is not affecting cellulose production, so we can conclude that CelC2 is not specific *in vitro* colonization in tested strains (figure 1).

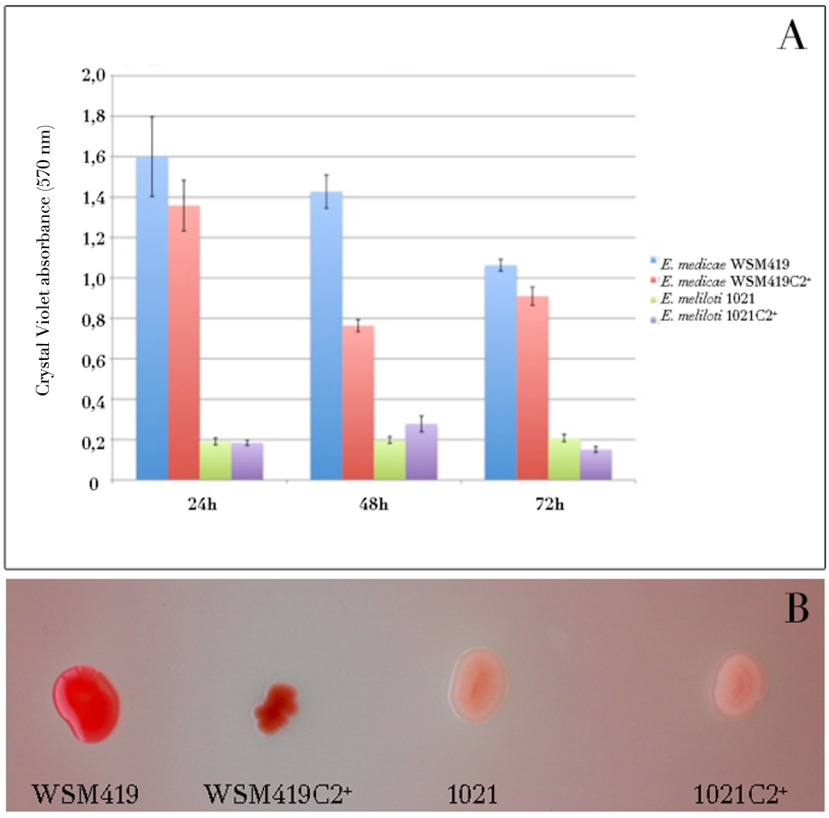
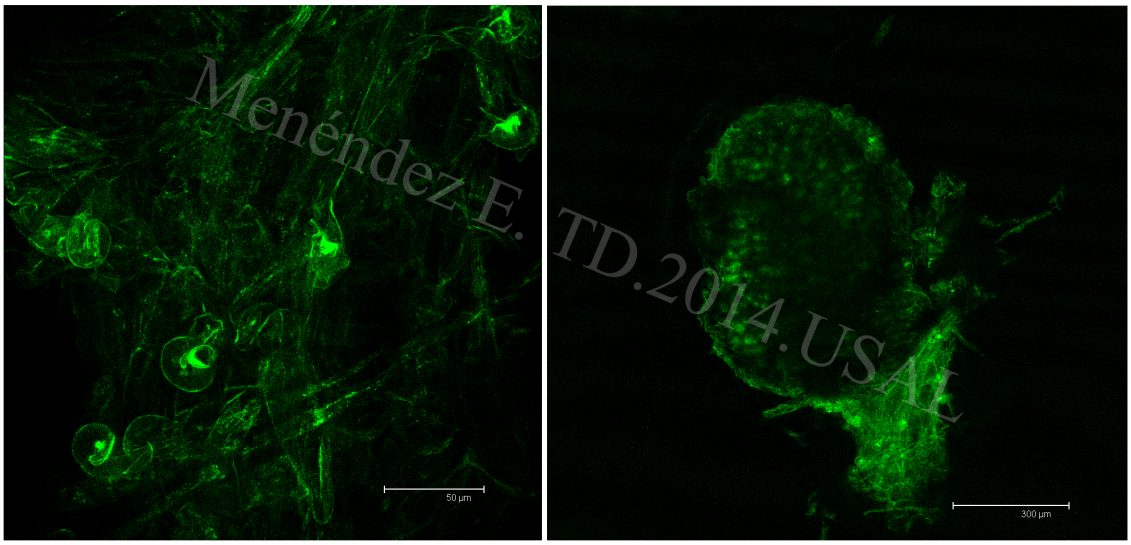


Figure 1. *In vitro* biofilm-forming capacity in PVC plates (A) and cellulose prodution qualitative assay in YMA media supplemented with Congo Red (B), which binds especifically to cellulose, of *E. medicae* WSM419, *E.meliloti* 1021 and its CelC2 derivatives. CelC2-overproducer mutants show no significative differences in those assays regarding to wild-type strains.

Prediction of a putative *celC* promoter

Previous studies in our group indicate there is a predicted promoter sequence in *celB* gene, which could be a possible candidate for regulating the expression of *celC* gene in ANU843. Using a transcriptional fusion between the

putative promoter region and the *green fluorescent protein (gfp)* reporter gene, *celC* gene was shown to be expressed during primary and secondary infection in *Trifolium* nodules (figure 2), seem to be induced by the plant cause no expression was showed in bacterial pure culture.



Menéndez E. TD.2014.USAL

Figure 2. *celC* gene expression zones in root hairs (A) and nodule (B) in *Trifolium repens*. Rhizobial cells expressing *gfp* from the *celC* promoter are located in the infection pockets, infection threads (A) and in the infection zone of the mature nodule (B), not expression is showed in fixation and senescence zone (B).

Our results point out the existence of a *celC* promoter/regulator sequence in *celB* gene, suggesting that this gene has several functions beyond being a structural protein in the cellulose biosynthesis complex.

CelC2/CelC implication in the *Medicago* - *Ensifer* infection process, nodule and plant development

In this work, we have mainly analyzed the implications of this particular enzyme in the symbiotic process: root surface colonization, primary infection, secondary infection, nodule and plant development. Moreover, symbiotic phenotypes in *Medicago truncatula* were evaluated, analyzing several plant development-related parameters. To summarize, a table with the results extracted for the different combinations *rhizobia*-legume tested in this thesis are shown below (table 2).

Table 2. Summary of symbiotic phenotypes observed in the different combinations rhizobia-plant used in our studies.

		Colonization		Primary infection				Secondary infection			Plant development	
Plant-*rhizobia* assays		Root surface	Root hairs	noi	Had + Hac	HoT	RaT	Nodule number	Effective	Symbiosome presence	Aerial part weight	N_2
Trifolium repens (clover)	Uninoculated	-	-	-	-	=	=	-	-	-	=	=
	*Rlt*ANU843	+	+	+	↑	↑	↑	16**	+	+	↑**	↑**
	*Rlt*ANU843C2$^+$	+	-	+	↓	↑↑	↑↑	13**	-	-	↓**	↓**
	*Em*1021	+	+/-	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-
	*Em*1021C2$^+$	+	-	-	-	↑↑	↑↑	-	-	-	-	-
	*Em*WSM419	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	*Em*WSM419C2$^+$	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	*Em*WSM419EMC$^+$	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Medicago sativa (lucerne)	Uninoculated	-	-	-	-	=	=	-	-	-	=	=
	*Rlt*ANU843	+	+/-	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-
	*Rlt*ANU843C2$^+$	+	-	-*	-	↓	↑↑	-	-	-	-	-
	*Em*1021	+	+	+	↑	↑	=	9**	+	++	↑**	↑**
	*Em*1021C2$^+$	+	-	+	↑	↓	↑↑	7**	-	-	↓**	↓**
	*Em*WSM419	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	*Em*WSM419C2$^+$	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	*Em*WSM419EMC$^+$	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Medicago truncatula (barrel medic)	Uninoculated	-	-	-	-	=	=	-	-	-	=	=
	*Rlt*ANU843	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	*Rlt*ANU843C2$^+$	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	*Em*1021	+	+	+	↑	↑	↑	15	+	+	↑	↑
	*Em*1021C2$^+$	+	-	+	↓	↑	↑↑	14	-	-	↓	↓
	*Em*WSM419	+	+	+	nd	nd	nd	34	++	+++	↑↑	↑↑
	*Em*WSM419C2$^+$	+	-	+	nd	nd	nd	19	-	-	↓	↓
	*Em*WSM419EMC$^+$	+	nd	+	nd	nd	nd	26	+/-	+/-	↑	↑

*Nodules rarely observed. **Data from Robledo TD, 2010. +/-, presence/absence; nd, non determined; ↑/↓increase/decrease

CelC2 shows host specificity in primary infection, cause it is not able to erode the root hairs apex in *Medicago* plants, not showing a significative increase of HoT phenotype in *Medicago* plants inoculated with a *celC*-expressing non-compatible *rhizobia* regarding to wild-type *rhizobia* inoculated plants. A new phenotype is proposed, called RaT (*Redirections at the Tip*), which is significatively increased in number in root hairs of CelC2-overproducer derivative inoculated plants (*Trifolium* and *Medicago*). This increase suggests CelC2 is responsible of that phenotype and is Nod-Factor independent. Analyzing and quantifying *Medicago* defence-related gene expression, such as Rip1 peroxidase, which is upregulated at 6 days post-infection, show that plant is responding to infection. *rip1* gene is normally expressed during first steps on infection, preventing ROS damage in the root hair apex. Our results show that this defensive response is not enough to abort the infection process, so plant is able to sense *celC* - overexpression.

Regarding to secondary infection and nodule development, our results show CelC2 is not host-specific in those steps, induce similar phenotypes in bacterial release and nodule features in *Trifolium* and *Medicago* nodules. CelC2 affects Bar phenotype, showing an intense bacterial release at the end of the infection threads, not allowing bacteria to form the symbiosome, leading to cell wall degradation in the infection zone, desorganizing nodule inner structure (figure 3).

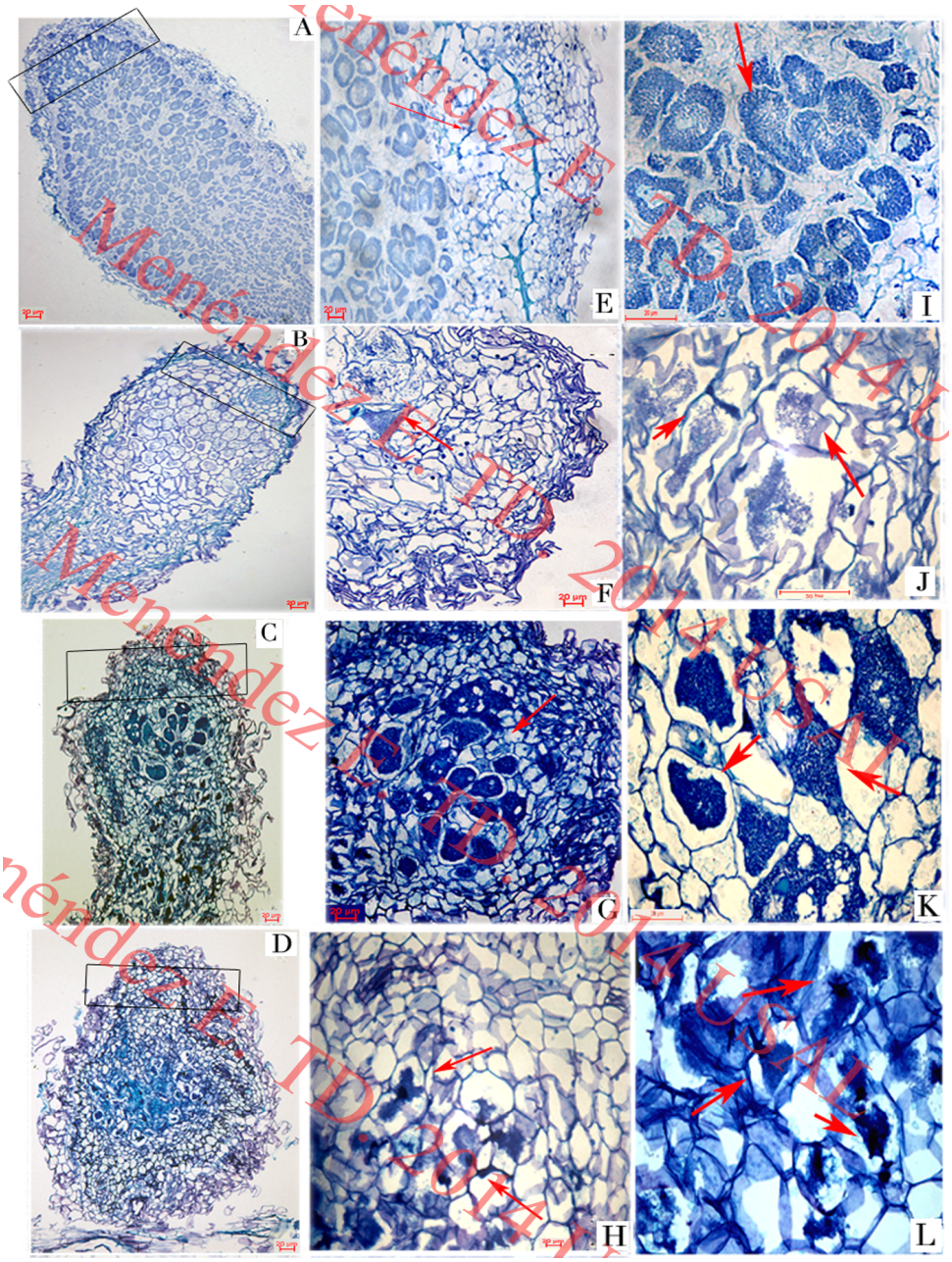


Figure 3. Nodule sections of *Medicago truncatula* plants inoculated with *E. meliloti* 1021 (A, E, I), *E. meliloti* 1021C2^{+} (B, F, J), *E. medicae* WSM419 (C, G, K) and *E. medicae* WSM419C2^{+} (D, H, L). Wild-type nodules of each strain exhibit typical invaded cells (A, E, C, G) but 1021 nodules (E) show less occupancy than WSM419 nodules (G). CelC2 derivative nodules in both strains exhibit inner desorganization at the infection zone level (B, F, D, H), showing alterated Bar phenotype and ineficciency in symbiosome formation (F, H). Naked bacteria degrade cell wall, producing the effect of desorganization (J, L). Arrows point the main events described in text and squares enclose nodule infection zones. Bars indicate scales 200 µm (A, B, C, D), 50µm (E, F, G, H) and 16 µm (I, J, K, L).

CelC2 - overproducer rhizobia cannot be differenciated in bacteroids, affecting Nitrogen Fixation. In this case, nodules are not effectives and most of them show aberrant morphology. Plant development is also affected, being the last consecuence of this unregulated infection process. Plants inoculated

with CelC2 derivative strains show a drecrease in plant development parameters such as dry weight and nitrogen content, but this development decrease is not as severe as in uninoculated plants.

Nevertheless, *Ensifer* CelC-overproducing strain inoculated *Medicago* plants show similar development to wild type inoculated *Medicago* plants. Nodules induced by WSM419EMC$^+$ are also desorganized but in a less severe grade, showing empty cells and *rhizobia* cells nested in intercellular spaces (figure 4). Further studies should be performed to understand the effect of *Ensifer* CelC in the symbiotic process.

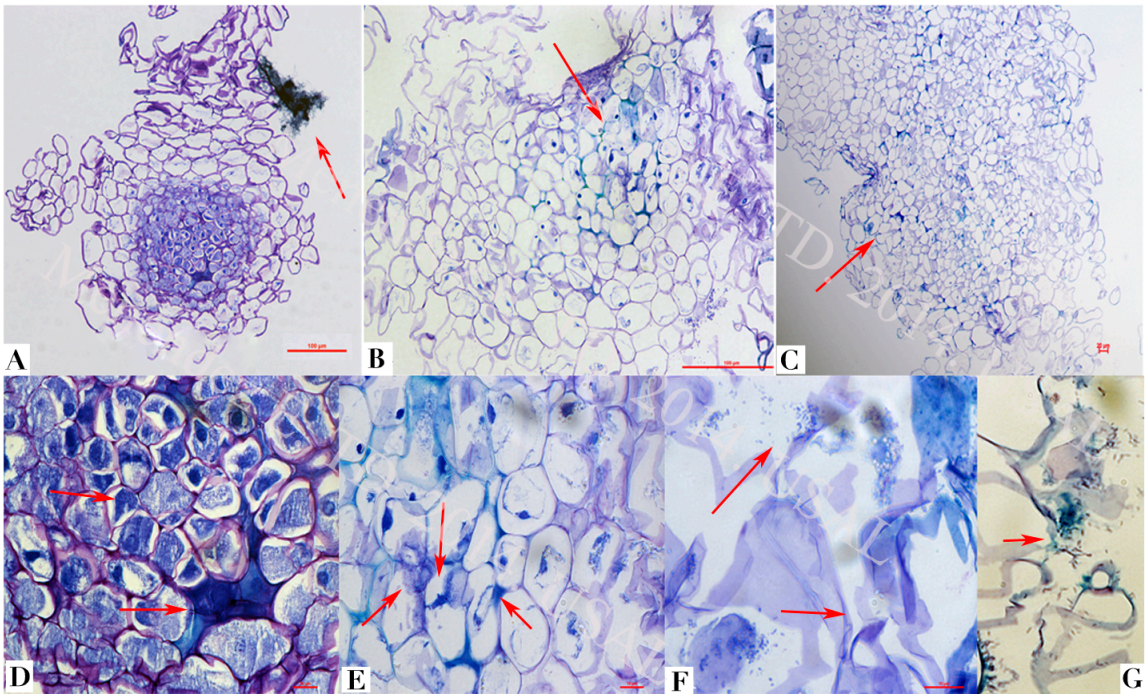


Figure 4. Nodule sections of *Medicago truncatula* plants inoculated with *E. medicae* WSM419EMC$^+$. Invaded nodules were observed (A), showing similar structures than wild type and bacterial cell as enclosed in intercellular spaces (D). Most of the nodules were empty (B, C), showing bacterial cells enclosed in intercellular spaces and infection threads (E). Naked bacteria are inside nodule cells (F) producing cell wall degradation (G). This phenotype is less severe than the phenotype observed with CelC2 derivatives. Arrows point the main events described in text. Bars indicate scales 200 µm (A), 100 µm (B, C), 50µm (D), 16 µm (E) and 8 µm (G).

CelC2 implications in cellulose biosynthesis *in planta*.

To understand the role of cellulase CelC2 in cellulose biosynthesis we have performed assays for obtaining *celC*- expressing transgenic roots in *Medicago truncatula*. By cultivating this plants under greenhouse conditions and in presence of Nitrogen in the fertilizer solution, we have obtained an

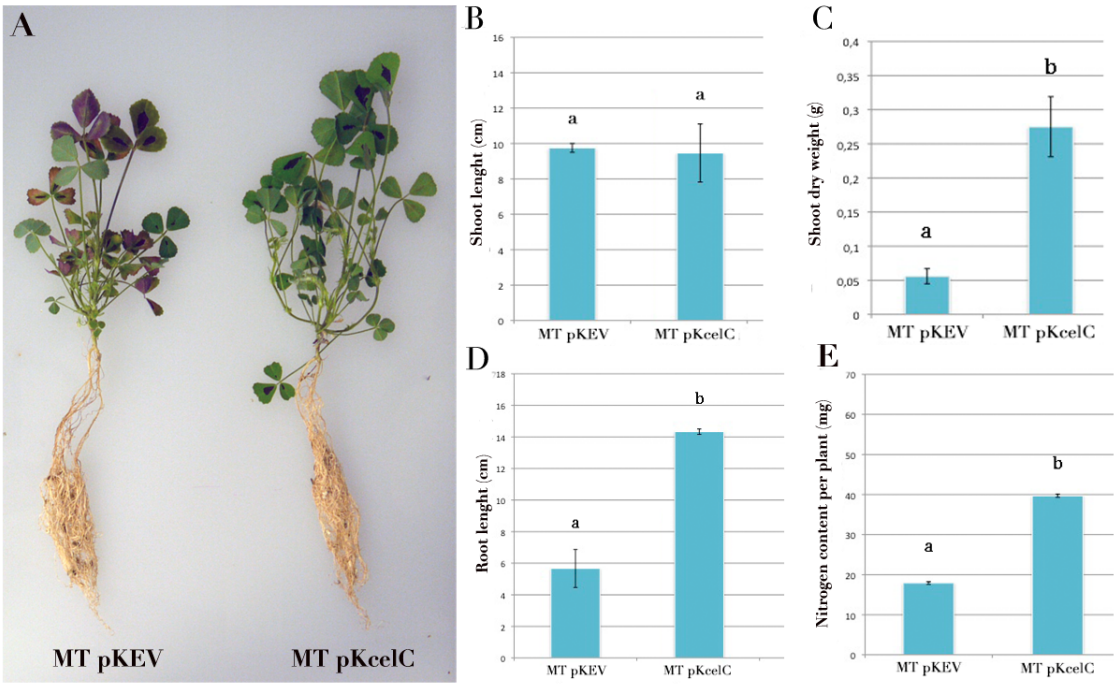


Figure 5. Root-transformed *Medicago* plants development. A, Whole plant phenotype root-transformed with pKEV versus pKcelC, cultivated in Nitrogen presence as fertilizer under greenhouse conditions during 3 months. B, shoot length; C, shoot dry weight; D, root length and E, Nitrogen content per plant. Graph columns represent the mean of at least 12 replica plants per treatment. Error bars indicate standard error. Values followed by the same letter are not signifficant from each other ($p \leq 0,05$).

Transformed plants expressing *celC* have and increased development, as revealed by shoot dry weight (figure 5 C), root length (figure 5 D) and Nitrogen content per plant (figure 5 E). CelC2-transformed plants are better developed than control plants, with an increase in Nitrogen content, sign of better rhizospheric Nitrogen assimilation. These data indicate that CelC2 could be involved in plant development, probably due to its implication in cellulose biosynthesis. Several studies report *Arabidopsis thaliana* transgenic lines, deffective in KORRIGAN endoglucanase, which are affected in plant development, exhibiting dwarfism (Nicol *et al.*, 1998; Zuo *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2001; Molhoj *et al.*, 2001). In the other hand, transgenic *Arabidopsis* lines overexpressing poplar KOR-*like* endoglucanases exhibit giantism and increased cell elongation in several organs (Park *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2009). Our results are in agreement with those studies, however, to confirm this cellulase implications in plant cellulose biosynthesis, further assays will be perfomed, such as a *celC* stable whole plant transformation.

Root-transformed plants cultivated in a similar way, except no Nitrogen was added to fertilizer solution and inoculated with *E. meliloti* 1021, show similar decreased phenotype than non-transformed plants inoculated with CelC2-overproducer strain, 1021C2^{+}. Primary infection in those plants was not

affected, showing typical phenotypes in a common cannonical infection pathway, confirming the host-specifity showed by this enzyme. Secondary infection and nodule development were compromised. Inner nodule structures were desorganizated and Bar phenotype is alterated, confirming the low efficiency in Nitrogen Fixation and the low *celc*-expressing root-transformed plant development due to CelC2 effects.

Conclusions

Due to the resuls presented in this thesis summary, we can conclude,

1. The *celABC* operon, involved in bacterial cellulose biosynthesis, is thoroughly distributed in the genus *Rhizobium* and related genera. Bioinformatic analyses predict a high similitude among genes conforming *Rhizobium* and *Ensifer celABC* operon. The operon localization, in the chromosome in the genus *Rhizobium* and in plasmids in the genus *Ensifer*, with the exception of *E. fredii* USDA257 and *E. adharens* OV14, suggests horizontal gene transfer ocurred in any evolutive period. Protein domain coincidences between the two genera support the hypothesis of a horizontal gene transfer from *Rhizobium* to *Ensifer*.

2. Through transcriptions fusions, the existence of a *celC* promoter/regulator sequence located in the *celB* gene is confirmed and exclusively promotes *celC* gene expression in plant presence, specifically in primary and secondary infection zones.

3. CelC2 cellulase shows unspecificity in surface colonization, either biotic or abiotic, affecting similarly different hosts. This phenotype confirms that colonization is independent of the rhizobial infection process. Nevertheless, CelC2 cellulase overproduction impairs cap formation on the root hairs apex, avoiding in some degree the correct "cannonical" infection.

4. CelC2 cellulase exhibits host specificity in primary infection. However, CelC2 cellulase heterologous expression significatively increases polar redirection (RaT) number, independently of the host plant.

5. Plant defence responses to *celC* - expressing transformants are not enough to abort the infection process, despite of the existence of ROS-involved gene expression deregulation.

6. CelC2 cellulase presents host unspecificity in secondary infection and nodule development, causing inner nodule desorganization by the rupture of cell walls located in the nodule infection zone. At this point, bacteria are not recovered by plant membrane and bacteroid differentiation does not occur. Symbiosoms are not observed, so nodules are not efficient for Nitrogen

Fixation. Plant development is significatively decreased as the rest of analyzed parameters. Nitrogen addition reverts this phenotype, confirming the involvement of this cellulase.

7. Comparative analysis of cellulose synthases and cellulases involved in plant and bacterial cellulose biosynthesis support the hyphotesis of a posible evolutive process from procarionts to higher plants.

8. In plant CelC2 cellulase expression confirms its possible implication in plant cellulose biosynthesis, supposing an increase in plant development.

9. Under rhizosphere Nitrogen-free conditions, *celC*-expressing plants phenotype confirms its inefficiency in Nitrogen Fixation, similar to the phenotype presented by *celC*-expressing transformants, either homologous or heterologous *celC*-expressing strain.