



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS



Departamento de Biotecnología

GENERACIÓN DE UNA MUTATECA EN
***Rhizobium Leguminosarum* PARA EL**
ANÁLISIS DE PROTEÍNAS
DE EXPORTACIÓN TAT-
DEPENDIENTES

JUAN ABAD ARRANZ
SEPTIEMBRE 2008

Este trabajo ha sido escrito y presentado para optar al título de Ingeniero Agrónomo por
la Universidad Politécnica de Madrid

El autor de este trabajo

Juan Abad Arranz

Vº Bº

Fdo: Luis Rey Navarro

Madrid, 12 de Septiembre 2008

Trabajo Fin de Carrera

Generación de una mutateca en *Rhizobium leguminosarum* para el análisis de proteínas de exportación Tat-dependientes

Tutor:

Luis Rey Navarro

Profesor Titular de Microbiología

Departamento de Biotecnología

Escuela Técnica superior de Ingenieros Agrónomos

Universidad Politécnica de Madrid

Madrid, Septiembre 2008

ÍNDICE

I ABREVIATURAS

II INTRODUCCIÓN

1. GÉNERO <i>Rhizobium</i>	5
2. TRANSPORTE DE PROTEÍNAS EN BACTERIAS.....	6
2.1 Sistema TAT (Twin Arginine Translocation).....	7
3. TRANSPORTADORES TIPO ABC (ATP-binding cassette).....	9

III OBJETIVOS

IV MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	12
1.1 Bacterias y plásmidos.....	12
1.2 Material vegetal.....	13
2. GENERACIÓN DE MUTANTES.....	13
2.1. Transposición aleatoria.....	13
2.2. Transferencia de plásmidos.....	14
2.2.1. Transformación en <i>E. coli</i>	14
2.2.2 Conjugación entre <i>E. coli</i> y <i>Rhizobium</i>	14
2.3. Número de mutantes y probabilidad de encontrar un mutante en un gen determinado.....	14
3. ANTIBIÓTICOS, ENZIMAS y REACTIVOS.....	15
4. CRECIMIENTO DE PLANTAS EN CONDICIONES BACTERIOLÓGICAMENTE CONTROLADAS.....	16

5. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	16
5.1. Medios de cultivo.....	16
5.2. Registro de las curvas de crecimiento.....	17
6. MANIPULACIÓN DE ADN.....	17
6.1. Extracción de ADN total.....	17
6.2. Extracción de ADN plasmídico.....	18
6.3. Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN.....	19
7. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.....	19
8. AMPLIFICACIÓN DE ADN POR PCR.....	19
9. OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO.	20
10. SECUENCIACIÓN DE ADN.....	21
11. ORGANIZACIÓN DE LA MUTATECA.....	22
11.1. Aislamiento de clones en medio de cultivo sólido.....	22
11.2. Obtención de lotes de ADN.....	23
11.3. Conservación de clones y ADN.....	25
11.4. Metodología empleada para la localización de mutantes en la mutateca.....	25

V RESULTADOS

1. GENERACIÓN DE MUTANTES.....	27
1.1. Selección de mutantes control.....	27
2. MUTANTES OBTENIDOS Y ORGANIZACIÓN DE LA MUTATECA.....	30
3. IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES CONTROL A PARTIR DE DIFERENTES LOTES DE ADN.....	31
4. LOCALIZACIÓN DE MUTACIONES EN GENES QUE CODIFICAN PARA PROTEÍNAS Tat-DEPENDIENTES.....	35

4.1. Localización de inserciones en genes de interés.....	35
5. ANÁLISIS DEL GEN <i>RL3370</i>	37
5.2. Análisis funcional de la proteína <i>RL3370</i>	42
5.3. Análisis del crecimiento del mutante <i>mutRL3370</i> de <i>Rhizobium leguminosarum bv viciae</i> en diferentes medios de cultivo.....	47
5.4. Simbiosis de <i>mutRL3370</i> con guisante (<i>Pisum sativum</i> L cv Frisson).....	48

VI DISCUSIÓN.

1. LA MUTATECA DE <i>Rhizobium leguminosarum</i> COMO HERRAMIENTA DE TRABAJO.....	50
2. LOCALIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE UN MUTANTES EN EL GEN <i>RL3370</i> DE <i>Rhizobium leguminosarum bv viciae</i>	52
3. CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA CEPA <i>mutRL3370</i>	53

VII CONCLUSIONES.

VIII BIBLIOGRAFÍA.

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

- Figura 1:** Modelo estructural y funcional del sistema Tat en *E. coli*.....8
- Figura 2:** Modelo de transporte ABC dependiente de una proteína de unión periplásmica.....10

MATERIALES Y MÉTODOS

- Figura 3.** Mutagénesis de *R. leguminosarum* por transposición aleatoria mTn5SoriRgusA.....13
- Figura 4.** Preparación de placas microtiter con medio e inoculación de los transconjugantes.....23
- Figura 5.** Obtención de lotes de colonias organizadas en pisos con 6 placas de microtiter.....24
- Figura 6.** Esquema del método empleado para la localización de mutantes.....26

RESULTADOS

- Figura 7.** Localización de la secuencia de la inserción del transposón en el mutante mutRL1960 de *Rhizobium leguminosarum*.....29
- Figura 8.** Esquema de la organización de la mutateca de *Rhizobium leguminosarum* y obtención de lotes de ADN.....30
- Figura 9.** Amplificación de ADN adyacente al transposón insertado en los mutantes control mutHupF y mutRL1960.....32
- Figura 10.** Identificación mediante PCR de una inserción en el gen RL3370.....35

Figura 11: Localización de una inserción en el gen <i>RL3370</i> de <i>Rhizobium leguminosarum</i> .	
A) Organización de la región de ADN que incluye el gen <i>RL3370</i> y localización de la inserción del transposón en el mutante mutRL3370.....	38
B) Detalle de la región analizada.....	38
Figura 12. Secuencia de la región de ADN de <i>R. leguminosarum</i> UPM791 que comprende el gen ortólogo a <i>RL3370</i> de <i>R. leguminosarum</i> 3841 (<i>RL3370</i> -UPM791).....	40
Figura 13. Organización de la región de ADN que contiene el gen <i>RL3370</i> en el genoma de <i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv viciae</i> 3841.....	40
Figura 14. Alineamiento de la proteína <i>RL3370</i> de las cepas de <i>R. leguminosarum</i> UPM791 y 3841.....	41
Figura 15. Homología significativa entre la proteína <i>RL3370</i> de <i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv viciae</i> y dominios conservados en agrupaciones de proteínas ortólogas (COG).....	45
Figura 16. Dibujo esquemático de la proteína <i>potD</i>	45
Figura 17. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína <i>RL3370</i> de <i>Rhizobium leguminosarum</i> con los aminoácidos de la proteína <i>PotD</i> de <i>Escherichia coli</i>	46
Figura 18 Crecimiento de las cepas de <i>R. leguminosarum</i> mut <i>RL3370</i> y UPM791 en medio Rmin.....	47
Figura 19: Fenotipo simbiótico de plantas de guisante inoculadas por distintas cepas de <i>R. leguminosarum</i>	48
Figura 20: Sistema radicular de guisantes infectados por las cepas UPM791 y mutRL3370 de <i>R. leguminosarum</i> <i>bv viciae</i>	49

ÍNDICE DE TABLAS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos.....12

Tabla 2. Relación entre un número de mutantes analizados y la probabilidad de encontrar un mutante en un gen determinado.....15

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.....20

I ABREVIATURAS

Aa	Aminoácido
ATP	5'-Trifosfato de adenosina
ABC	ATP Binding Cassette
ADN	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	5'-Trifosfato de 2'-desoxinucleico
DO ₆₀₀	Densidad óptica medida a 600 nm.
g	Gramos
<i>gus</i>	Gen de la β -glucuronidasa
h	Horas
Kb	Kilobase
Km	Kanamicina
min	Minuto
nM	nanomolar
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
Seg	Segundos
Spc	Espectinomicina
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
Wt	Wild type = cepa silvestre

II INTRODUCCIÓN

1. GÉNERO *Rhizobium*.

El género *Rhizobium* está constituido por bacterias capaces de establecer simbiosis con plantas de leguminosas y fijar nitrógeno mediante el complejo enzimático de la nitrogenasa. Estas bacterias pertenecen al grupo alpha-2 de las Proteobacteria (Jordan, 1982 & Dreyfus et al, 1983).

Las bacterias de *Rhizobium* son bacilos Gram-negativos no esporulados, que miden 0,5-1,0 x 1,3-3,0 μm y se mueven por medio de 1-6 flagelos que pueden ser peritricos o subpolares. Se multiplican en condiciones aerobias, y en el caso de muchas cepas, también en ambientes microaeróbicos. Son quimiorganótrofas, capaces de utilizar una amplia variedad de azúcares relativamente simples y compuestos aminados como fuente de carbono y energía.

Las raíces de leguminosas segregan flavonoides e isoflavonoides los cuales son reconocidos específicamente por determinados rizobios y a su vez las bacterias excretan compuestos que inducen la formación de nódulos en la raíz. Dentro de los nódulos se crea un ambiente microaeróbico necesario para que el complejo enzimático bacteriano de la nitrogenasa lleve a cabo la reducción del nitrógeno atmosférico hasta amonio, el cual va a ser asimilado por la planta a través de la glutamino sintetasa.

La importancia del proceso de fijación de nitrógeno es evidente si tenemos en cuenta que el nitrógeno representa después del agua, el principal factor limitante de la producción agrícola mundial a pesar de ser el gas más abundante en la atmósfera (79% de la misma). Por este motivo resulta tremendamente interesante el estudio de la función de los distintos genes que intervienen en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas.

Se han establecido diferentes especies de Rizobios en base a la especificidad del hospedador y otras características fisiológicas y genéticas. Dentro del género *Rhizobium* se encuentra la especie *Rhizobium leguminosarum* (Wang & Martínez-Romero, 2000). Respecto a esta última se han diferenciado 3 biovares en función de la leguminosa hospedadora, así pues podemos distinguir *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* (lleva a cabo la formación de nódulos en plantas de guisante, almorta, lenteja o veza), *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* (lleva a cabo la formación de nódulos en tréboles) y *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* (lleva a cabo la formación de nódulos en

plantas de judía).

El estudio y la mejora de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa tienen un gran interés, especialmente cuando se pretende disminuir la contaminación producida por el aporte de fertilizantes nitrogenados.

En trabajos previos realizados en este laboratorio se ha demostrado que el transporte de proteínas en *Rhizobium leguminosarum bv viciae*, fuera del espacio citoplásmico, es esencial en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (Meloni et al, 2003).

2. TRANSPORTE DE PROTEÍNAS EN BACTERIAS.

Una función clave en todos los seres vivos, tanto en eucariotas como en procariotas es el transporte de proteínas a través de la membrana plasmática. Esta translocación es necesaria para ubicar dichas proteínas en el lugar donde tienen que realizar su función ya sea en el exterior celular o en el espacio periplásmico de Gram negativas.

La importancia de este proceso puede apreciarse en *E. coli* (bacteria Gram negativa) donde son transportadas alrededor de 250 proteínas, el 6 % de las proteínas codificadas por su genoma y en *Bacillus subtilis* (bacteria Gram positiva) donde se ha propuesto que se transporta hasta el 7 % del proteoma a través de la membrana plasmática (Robinson y Bolhuis, 2004). También se ha establecido que en bacterias capaces de infectar hospedadores eucariotas, las proteínas secretadas tienen un papel muy importante (Oliver D. B., 1996).

La translocación de proteínas en bacterias puede ser llevada a cabo por varios sistemas. Algunos de estos sistemas reconocen una extensión amino terminal hidrofóbica en la proteína que va a ser trasladada que se denomina péptido señal, ésta es la encargada de dirigir la translocación de dichas proteínas.

Se conocen 3 sistemas dependientes de péptido señal responsables de la secreción de proteínas a través de la membrana citoplasmática bacteriana. Estos sistemas se denominan: Sec (General Secretory Pathway), SRP (Signal- Recognition Particle) y Tat (Twin Arginine Translocation).

Los sistemas Sec y SRP están presentes en todos los organismos (procariotas y eucariotas). El sistema Tat se ha identificado en la mayoría de los genomas de

eubacterias y arqueobacterias (Berks, 1996; Santini et al, 1998; Sargent et al, 1998) y en el genoma de cloroplastos.

En la interacción *Rhizobium*-leguminosa, las proteínas localizadas en el espacio periplásmico de la bacteria tienen un papel relevante. Parte de estas proteínas son translocadas por el sistema Tat. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el sistema Tat es esencial para la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (Meloni et al, 2003).

2.1 Sistemas TAT (Twin Arginine Translocation).

El sistema Tat transloca proteínas que contienen péptidos señal caracterizados por una secuencia consenso que incluye una pareja de argininas y que da nombre al sistema (Twin Arginine Translocation) (Berks B, 1996). Es un modo de exportación de proteínas paralelo al sistema Sec, independiente de ATP, dependiente de gradiente de pH (Robinson et al, 1994) y capaz de transportar proteínas de diferentes tamaños en conformación plegada, a través de la membrana citoplásmica.

Trabajos en *E. coli* han permitido identificar los principales determinantes genéticos del sistema Tat. Estos determinantes se denominan *tatA*, B, C y E. Así el sistema Tat de *E. coli* está constituido por 4 genes que codifican proteínas integrales de membrana TatA (9.6 kDa), TatB (18.4 kDa), TatC (28.9 kDa) y Tat E (7 kDa) (Robinson y Bolhuis, 2004), 3 de ellos corresponden a un único operón (*tatABC*) y el cuarto corresponde a un gen, *tatE* monocistrónico localizado en otro lugar del genoma (Wexler et al, 1998).

En nuestro laboratorio se está caracterizando el sistema Tat de dos cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*, la cepa 3841, secuenciada y anotada (Young et al, 2006) y la cepa UPM791, cepa de trabajo de nuestro laboratorio, de la que en estos momentos disponemos de aproximadamente el 90% de su genoma sin anotar. Un primer análisis del genoma de la cepa 3841, utilizando el programa informático Tat Find 1.4 (Pallen et al, 2003), para identificar posibles proteínas dependientes del sistema Tat permitió identificar 102 candidatos (Jiménez A., 2006). Entre las 102 proteínas dependientes del sistema Tat en la cepa 3841, cabe destacar que el 37% serían proteínas periplásmicas de unión a sustrato que formarían parte de sistemas de transporte de tipo ABC. La función precisa de la mayoría de estas proteínas no se conoce.

Por otra parte se ha realizado un análisis sobre la conservación de las proteínas extracitoplásmicas dependientes del sistema Tat entre las cepas 3841 y UPM791 que mostró que el 90% de las proteínas identificadas en la cepa 3841 estaban presentes en la cepa UPM791, considerando como proteínas conservadas aquéllas que tenían una identidad de aminoácidos superior al 50% (datos no presentados).

Experimentalmente, mediante geles bidimensionales, se ha comparado el proteoma periplásmico de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* 3841 (cepa silvestre) y 3861 (cepa mutante *tat*) y se han podido identificar cinco proteínas dependientes del sistema Tat, homólogas a proteínas periplásmicas de unión a sustratos, que podrían formar parte de sistemas de transporte ABC (Jiménez A., 2006).

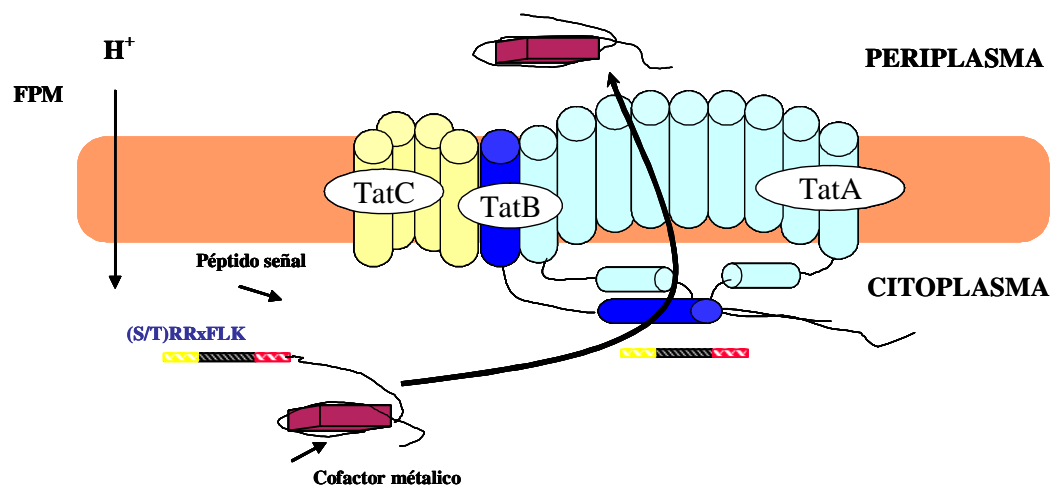


Figura 1. Modelo estructural y funcional del sistema Tat en *E. coli*. El esquema representa el transporte de una proteína con cofactor metálico, a través del sistema Tat. La proteína TatC interacciona con el péptido señal (Cline & Mori, 2001), dirigiendo las proteínas hacia la membrana interna a través del poro de membrana formado por 20 copias de TatA (Berks B., 2001). Derivado de Berks et al, 2000.

3. TRANSPORTADORES TIPO ABC (ATP-binding cassette).

Los transportadores ABC son transportadores primarios que translocan un sustrato a través de una membrana biológica en contra de un gradiente de concentración. Para poder realizar la translocación, el transportador primario ha de acoplar el proceso de transporte a otro proceso que produzca energía, la hidrólisis de ATP, y ser capaz de prevenir que los dos procesos puedan darse de manera desacoplada en sus direcciones energéticamente favorables. De los sistemas de transporte primarios, la superfamilia ABC es la única capaz de transportar aminoácidos (del Río C., 2007). Son vías de transporte unidireccionales que pueden ser de importación y exportación ó sólo de importación en procariotas. El núcleo del transportador ABC lo componen dos tipos de unidades; un par de de módulos transmembrana (TM) que rodean y definen la vía de permeabilidad y un par de módulos periféricos que se unen al ATP y lo hidrolizan. Estos cuatro dominios funcionales pueden ser codificados de forma separada formando subunidades individuales ó de forma conjunta como dominios de una proteína más grande. Entre los procariotas estos cuatro dominios suelen codificarse por separado (Davidson & Maloney, 2007) (Davidson et al, 2008).

Los transportadores ABC de importación, además pueden incluir una proteína periplásmica que se une al sustrato con una gran afinidad. Estas proteínas deben permanecer ligadas al poro transportador para conducir eficientemente el sustrato hasta el citoplasma. Existen 3 tipos de proteínas de unión periplásmicas, los tipos 1 y 2 reconocen mono y disacáridos, aminoácidos o iones mientras que el tipo 3 interaccionaría con gran cantidad de sustratos entre los que se encuentran quelatos metálicos o vitamina B₁₂ (Davidson & Maloney, 2007) (Davidson et al, 2008).

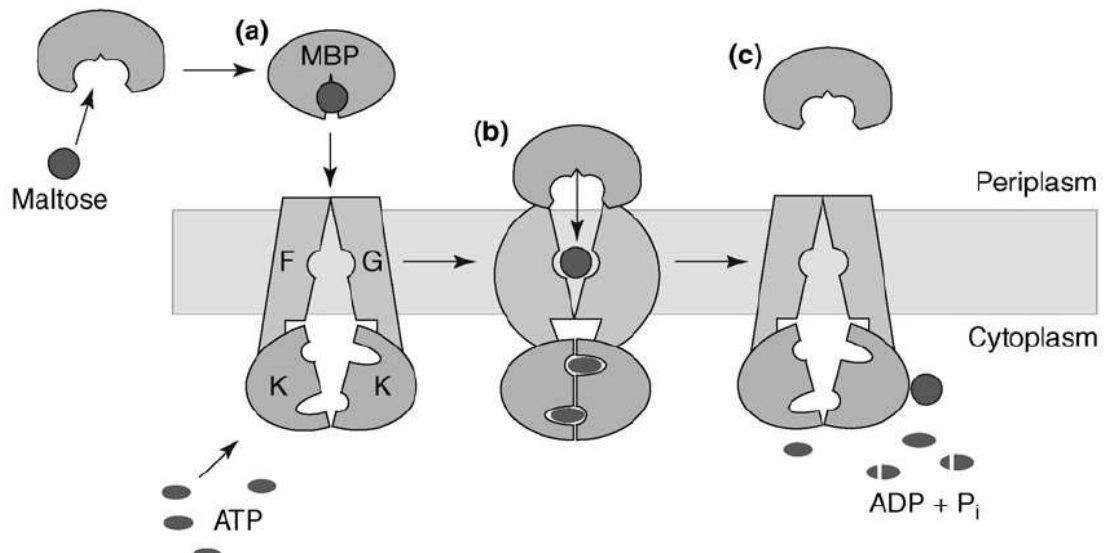


Figura 2. Modelo de transporte ABC dependiente de una proteína de unión periplásmica.

(a) La proteína de unión a maltosa (MPB) envuelve el azúcar y lo dirige al transportador. (b) La interacción entre MPB y el ATP con el transportador favorece un cambio de conformación del transportador (c) La siguiente hidrólisis de ATP reorienta el transportador y libera el azúcar. Basada en la figura de Davidson & Maloney (2007).

III OBJETIVOS

Rhizobium leguminosarum bv *viciae* es el endosimbionte de guisantes, lentejas, vezas y almortas. El estudio de la biología molecular de *Rhizobium* puede permitir encontrar estrategias para mejorar la eficiencia de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

Trabajos previos realizados en departamento de Biotecnología de la Escuela de Agrónomos de Madrid a partir de la secuencia de la cepa 3841 permitieron identificar un grupo de 102 proteínas de función extracitoplásmica dependientes de un sistema de transporte específico denominado sistema Tat. Entre estas proteínas se encuentran varias esenciales para la fijación biológica de nitrógeno en simbiosis con leguminosas (Meloni et al, 2003 & Jiménez, A. 2006). Muchas de estas proteínas, son proteínas periplásmicas de unión a substratos que formarían parte un sistema de transporte de tipo ABC.

Los objetivos propuestos con este trabajo son:

- 1) Generación de una mutateca de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* UPM791 por transposición aleatoria.
- 2) Identificación de nuevos mutantes en alguno de los genes que codifican para proteínas de unión a substratos dependientes del sistema Tat.
- 3) Análisis de mutantes en genes que codifican proteínas periplásmicas Tat-dependientes obtenidos a partir de la mutateca.

IV MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO.

1.1 Bacterias y plásmidos.

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se recogen en la tabla 1.1 y los plásmidos empleados en la tabla 1.2.

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos.

Bacterias	Características relevantes	Fuente o referencia
<u>Rhizobium leguminosarum</u> bv. <u>viciae</u>		
UPM791	128C53;Cepa silvestre Str ^f Nod ⁺ Fix ⁺ Hup ⁺	(Ruiz-Argüeso et al, 1978)
mutRL1960	UPM791 <i>RL1960</i> :: mTn5SSoriRgusA	Este trabajo.
mutHupF	UPM791 <i>HupF</i> :: mTn5SSoriRgusA	Este trabajo.
mutRL3370	UPM791 <i>RL3370</i> :: mTn5SSoriRgusA	Este trabajo.
<u>Escherichia coli</u>		
DH5α	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 Δ(lacZYA-argF) U196λ- (Φ80 lacZ) ΔM15)</i>	Hanahan (1983). Bethesda Research Laboratories.
S17.1	<i>thi pro hsdR⁻ hsdM⁺ recA</i> RP4:2- Tc::Mu-Km::Tn7 (Tp ^r /Sm ^r)	Simon et al, (1983).
Plásmidos		
Plásmidos referencia	Características relevantes	Fuente o referencia
pSS240	Vector derivado de pCAM140, contiene el minitransposón mTn5SSoriRgusA con origen de replicación del plásmido pMBL; Spc ^r , Ap ^r	Di Gregorio et al, 2004

1.2 Material vegetal.

En los ensayos de plantas se utilizaron plantas de guisante (*Pisum sativum* L cv. Frisson) como leguminosa hospedadora de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*.

2. GENERACIÓN DE MUTANTES.

2.1. Transposición aleatoria.

Se obtuvo una colección mutantes de *R. leguminosarum* por transposición aleatoria. Se llevó a cabo por conjugación de la cepa S 17.1 de *E. coli* portadora del plásmido pSS240 que contiene el minitransposón mTn5SSoriRgusA y la cepa receptora de *Rhizobium leguminosarum* UPM791.

Los transconjugantes se seleccionaron en medio Rmin y espectinomicina. (ver figura 3).

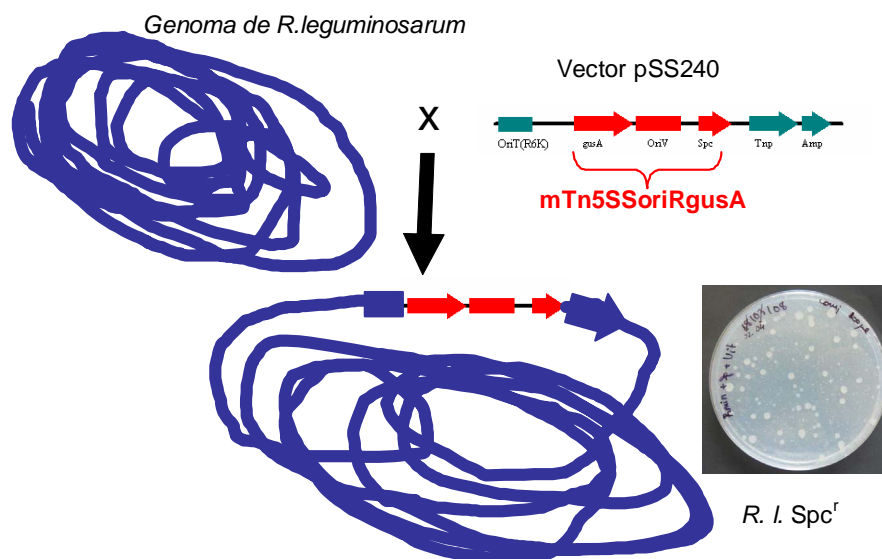


Figura 3. Mutagénesis de *R. leguminosarum* por transposición aleatoria mTn5SoriRgusA.

Conjugación de la cepa de *R. leguminosarum* UPM791 y la cepa de *E. coli* S 17.1 portadora del plásmido pSS240. La placa corresponde a transconjugantes seleccionados en medio Rmin + espectinomicina.

2.2. Transferencia de plásmidos.

2.2.1. Transformación en *E. coli*

La preparación de células competentes de *E. coli* DH5 α y la transformación de las mismas con ADN se realizó mediante el método de Hiroaki *et al.* (1990), que requiere el crecimiento de las células a 18 °C. La selección de los transformantes se realizó en medio LB suplementado con el antibiótico.

2.2.2 Conjugación entre *E. coli* y *Rhizobium*.

Las conjugaciones entre *E. coli* S 17.1 y cepas de *Rhizobium* se realizaron según el método de conjugación biparental en filtro. Se emplearon para ello 0,5 ml de células de *Rhizobium* crecidas en medio TY (a D.O₆₀₀=0,4-0,6) y 0,5 ml de células de *E. coli* S17.1 (a D.O₆₀₀=0,1-0,2), se centrifugaron conjuntamente en un tubo estéril y una vez retirado el sobrenadante, se depositó el pellet sobre un filtro estéril con poro de 0,2 μ m. A continuación se incubaron a 28 °C durante una noche en placas TY. Los transconjugantes se seleccionaron a partir de la mezcla de conjugación mediante siembras sucesivas de colonias aisladas en medio Rmin suplementado con el antibiótico correspondiente.

2.3. Número de mutantes y probabilidad de encontrar un mutante en un gen determinado.

Para estimar la relación entre el número de mutantes obtenidos y la probabilidad de encontrar un mutante en un gen determinado, se utilizó la fórmula: $N = \ln(1-p) / \ln(1-f)$ (Sambrook y Russell 2001). **N** es el número de mutantes empleados, **p** es la probabilidad de encontrar un mutante en un gen determinado y **f** es la proporción de mutación en un gen determinado. Teniendo en cuenta *Rhizobium leguminosarum* 3841 tiene 7263 genes (Young *et al.*, 2006) y que la cepa *Rhizobium leguminosarum* UPM791 parece tener un genoma de tamaño similar (datos de este laboratorio no publicados), y realizando la simplificación de considerar todos los genes con la misma frecuencia de transposición se ha considerado $f = 1 / 7.263$. La probabilidad de encontrar un mutante respecto al número de clones se indica en la tabla 2.

Tabla 2. Relación entre un número de mutantes analizados y la probabilidad de encontrar un mutante en un gen determinado.

Número de clones	Numero de pisos *	probabilidad
576	1	0,07
2.880	5	0,32
5.760	10	0,54
13.824	24	0,85

* Los mutantes se organizan en pisos de 24 filas x 24 columnas.

3. ANTIBIÓTICOS, ENZIMAS y REACTIVOS.

Los antibióticos se obtuvieron de Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Alemania), Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, EE UU), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemania). Las soluciones concentradas de antibióticos fueron preparadas y almacenadas según se describe en Sambrook y Russell (2001).

Las enzimas de restricción y la ADN ligasa del bacteriófago T4, se obtuvieron de Roche Diagnostics GmbH (antes Boehringer Mannheim) (Mannheim, Alemania); la *Taq* ADN polimerasa de Pharmacia (Upsala, Suecia) y la *PfuUltra* High-fidelity DNA polimerasa de Stratagene (La Jolla, EE UU). Estas enzimas se utilizaron siguiendo las recomendaciones de las casas proveedoras.

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico y procedían de Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma-Aldrich Co, Serva Feinbiochemica, Panreac (Montplet & Esteban SA, Barcelona, España) y Bio-Rad (Richmond, California, EEUU).

4. CRECIMIENTO DE PLANTAS EN CONDICIONES BACTERIOLÓGICAMENTE CONTROLADAS.

Se siguió esencialmente la técnica descrita por Leyva et al (1987). Las semillas de guisante se desinfectaron superficialmente en una solución de hipoclorito sódico doméstico diluido un 25%, se lavaron con agua estéril, y se dejaron germinar en placas de agua con agar al (1%) durante 3 días a 28 °C y se sembraron en unidades tipo Leonard con vermiculita como soporte inerte; cada unidad se inoculó con 10 ml de un cultivo de *Rhizobium* crecido en medio YMB a 28 °C durante tres días (aproximadamente 10^8 - 10^9 bacterias/ml). Las plantas se desarrollaron en una cámara climática provista de iluminación (16 h/día) de $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y un ciclo de temperatura día/noche de 25/18 °C.

5. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

5.1. Medios de cultivo.

Las cepas de *Escherichia coli* se cultivaron a 37° C en medio Luria-Bertani (**LB**). La composición y forma de preparación de estos medios se obtuvieron de Sambrook y Russell (2001).

Las cepas de *Rhizobium* se cultivaron a 28°C en los siguientes medios de cultivo:

Medio mínimo de *Rhizobium* (**Rmin**) (glutamato 1 g/l, manitol 1 g/l, KH_2PO_4 0,3 g/l, Na_2HPO_4 0,3 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/l, CaCl_2 5 mg/l, H_3BO_3 10 mg/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/l, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mg/l, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mg/l, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 mg/l, FeCl_3 1 mg/l, biotina 1 $\mu\text{g/ml}$, tiamina 1 $\mu\text{g/ml}$, pantetonato cálcico 1 $\mu\text{g/ml}$) (O'Gara y Shanmugam, 1976) para selección de transconjugantes y crecimiento general de las cepas.

TY (extracto de levadura 3 g/l, triptona 6 g/l, Cl_2Ca 0,5 g/l) (Beringer, 1974) para extracción de ADN plasmídico y genómico.

Todos los medios se prepararon en agua destilada y se esterilizaron a 115°C durante 20 min. Cuando fue necesario, las cepas de *E. coli* y *Rhizobium* se conservaron congeladas en tubos Eppendorf a -70°C en medio de cultivo con 20% de glicerol.

Cuando fue necesario se añadió una solución del antibiótico de espectinomicina (Spc), se hizo a una concentración 50 µg/ml, esterilizada previamente por filtración. Cuando se requirió medio sólido se añadieron 15 g de agar por cada litro.

5.2. Registro de las curvas de crecimiento.

Para realizar los ensayos se crecieron los cultivos con agitación a 150 rpm suave a una temperatura de 28 °C entre 36-48 horas en medio Rmin, Rmin sin glutamato y 1 g/l de putrescina y por último Rm sin glutamato y 1 g/l de espermidina. Se ajustó la densidad óptica de partida a 600 nm diluyendo los cultivos a 0,1.

6. MANIPULACIÓN DE ADN.

6.1. Extracción de ADN total.

La obtención de ADN total de *Rhizobium* se realizó basándose en el método descrito por Leyva et al, 1987, y que consiste en:

1. Resuspender con ayuda de un rastrillo las colonias de una placa añadiendo a cada placa una solución de NaCl 0.1 M (1ml por cada 24 colonias aproximadamente).
2. Posteriormente recoger la mezcla con una pipeta, transferirla a tubos de 1,5 ml y centrifugar a 12.000 rpm durante 3 minutos.
3. Lavar 2 veces en 0.01 M de NaCl, añadiendo 1 ml cada vez.
4. Resuspender el pellet en 200 µl de TE (50 mM Tris/ 20 mM EDTA).
5. Añadir 250 µl de Sarkosil al 2% y 50 µl de pronasa (50 mg/ml).
6. Incubar a 37 °C durante una hora.
7. Agitarlos durante 30 segundos aproximadamente para romper el ADN.
8. Añadir 250 µl de NH₄Ac 7,5 M frío, agitar para mezclar bien, y dejar 10 minutos en hielo.
9. Centrifugar 5 minutos a 12.000 rpm y transferir el sobrenadante a un tubo limpio.

10. Precipitar con 450 µl de isopropanol y centrifugar 5 minutos a 12.000 rpm.
Secar el pellet.
11. Resuspender en 490 µl de agua (para ello calentar a 65 °C durante 10 minutos).
12. Añadir 10µl de NaCl 5M y 1 ml de etanol. Centrifugar 5 minutos a 12.000 rpm.
13. Lavar con Etanol al 70% frío y centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm.
14. Tirar el sobrenadante y dejar secar el pellet.
15. Resuspender en 50 µl de agua.

Los lotes de ADN se conservan a -70°C en tubos eppendorf. Se encuentran separados en lotes de ADN de cada piso sus correspondientes lotes de ADN de filas x columnas.

6.2. Extracción de ADN plasmídico.

La extracción de ADN plasmídico de células de *E. coli* o *Rhizobium* se realizó siguiendo esencialmente el método de la lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly (1979) e Ish-Horowicz y Burke (1981), o lisis por ebullición descrito por Sambrook y Russell (2001). Para el aislamiento de ADN a pequeña escala (minipreparación), utilizado en los análisis de restricción, se partió de un volumen de cultivo en fase exponencial de 1,5 ml para *E. coli*. El precipitado de ADN plasmídico se suspendió en 20 µl de agua estéril.

6.3. Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN.

Los fragmentos de ADN de las cepas de *Escherichia coli* seleccionadas tras la transformación fueron generados por digestión enzimática y se separaron por electroforesis en geles de agarosa (Sambrook y Russell 2001). La purificación se realizó mediante el kit “GeneClean” (MP Biomedicals, LLC, EEUU), siguiéndose en este caso las indicaciones de la casa comercial.

7. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.

Los fragmentos de restricción de ADN se resolvieron por electroforesis en geles horizontales de agarosa sumergidos en tampón TBE (Sambrook y Russell 2001). La concentración de agarosa varió según el tamaño de los fragmentos de restricción que se pretendía separar. Las muestras de ADN se mezclaron con 1/5 del volumen final con tampón de carga (60% glicerol, 20 mM EDTA, 0,25% azul de bromofenol, 20 U. ribonucleasa A/ml). El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó por su movilidad electroforética, utilizando como referencia fragmentos *HindIII* de ADN de bacteriófago λ (Boehringer Mannheim) y del marcador comercial de peso molecular 100 pb ADN Ladder Plus (MBI Fermentas, Lituania).

8. AMPLIFICACIÓN DE ADN POR PCR.

La amplificación de fragmentos de ADN mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por la casa comercial Boehringer Mannheim para este tipo de reacciones. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma-Aldrich (Reino Unido). La polimerasa utilizada, Taq ADN Polymerase, fue suministrada por Amersham Pharmacia Biotech. Las cantidades de cada reactivo para llevar a cabo la PCR fueron las siguientes: 1 μ l de ADN molde plasmídico (50-200 ng), 2,5 μ l tampón TaqPCR (con $MgCl_2$), 0,5 μ l de mezcla de dNTPs (10 mM de cada dNTP), 1 μ l de cada oligonucleótido (10 pmoles / μ l) y 0,5 μ l de Taq ADN Polymerase (5 uds / μ l), llevándolo a un volumen final de 25 μ l con agua destilada estéril.

El programa de PCR seguido para localizar mutantes de la genoteca fue el siguiente: 5 minutos a 94 °C; 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 55 °C, 45 segundos a 72 °C; se incluyó una elongación de 5 minutos a 72°C.

9. OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO.

El diseño de los oligonucleótidos se realizó siguiendo el programa “Oligo” (Molecular Boilogy Insights, Inc).

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Utilizado para
aadA1846	GCTGGCTTTTTCTTGTTATCG	Amplificación de la región adyacente al gen de resistencia a espectinomicina del mTn5SSoriRgusA.
Oend	GCACTTGTGTATAAAGAGTCAG	Amplificación de la región adyacente al gen <i>gusA</i> del mTn5SSsoiriRgusA.
U100348	TCTGTTCGACGGTGGTT	Amplificación del gen pRL100348 (5')
L100348	GGTCGACGG CTTGTTGA	Amplificación del gen pRL100348 (3')
U100337	CCACGACGAACTCAGGA	Amplificación del gen pRL100337 (5')
L100337	GCACGACCAGCCGAATA	Amplificación del gen pRL100337 (3')
U3370	GAGCGTGTCGGTGTAGT	Amplificación del gen RL3370 (5')
L3370	GCTCGGCATCACCTTCG	Amplificación del gen RL3370 (3')
U90203	CG TCTTGGTTT TCTTG	Amplificación del gen pRL90203 (5')
L90203	GCGCGTCGGCTTCATTC	Amplificación del gen pRL90203 (3')
preHupF	TAGATTCGGACGGAGAT	Amplificación del gen <i>hupF</i> utilizado como control.
preRL1960	GCGCCGGTGAAGAGGTC	Amplificación del gen RL1960 utilizado como control.
U4142	GTGCTGCCTTCTTCCT	Amplificación del gen U4142(5')
L4142	GCCGTCCTTGTCATTCG	Amplificación del gen L2713 (3')

U3370-W5	TCGACCAAGGCGGAGAA	Amplificación del gen U3370-W5
L3370-W5	CCATGCAGGCGGAATAA	Amplificación del gen L3370-W5

10. SECUENCIACIÓN DE ADN

Para la secuenciación automática se partió de ADN plasmídico obtenido según los protocolos descritos en el apartado 6.2 habiéndose purificado con el kit GeneClean (MP Biomedicals, LLC, EEUU). Posteriormente las reacciones de secuenciación se procesaron en el Servicio de Secuenciación de SECUGEN, Madrid.

11. ORGANIZACIÓN DE LA MUTATECA.

11.1. Aislamiento de clones en medio de cultivo sólido.

La mutateca se organiza en pisos de 24 filas x 24 columnas (576 mutantes por piso). Un piso está compuesto seis placas microtiter de 12 x 8 pocillos que contienen 180 µl de medio sólido Rmin con espectinomicina. Para añadir el medio Rmin a las placas de microtiter primero se fundió el medio y una vez enfriado a unos 60 °C aproximadamente, se añadieron las vitaminas y el antibiótico espectinomicina. Con el fin de que el medio no se solidificase se vertió en una placa petri estéril de cristal que se depositó sobre una placa metálica caliente (a 65°C aproximadamente). A partir de la placa se tomaron con una pipeta multicanal 180 µl de medio que se depositaron en cada uno de los pocillos. Para evitar la formación de burbujas se cortaron las puntas previamente a su esterilización.

Una vez solidificado el medio en las placas de microtiter, se inoculó cada pocillo con una cepa mutada de *Rhizobium* utilizando un palillo estéril. Los microtiter inoculados

se incubaron a 28 °C durante 4 días hasta observarse crecimiento de los transconjugantes (ver figura 4).

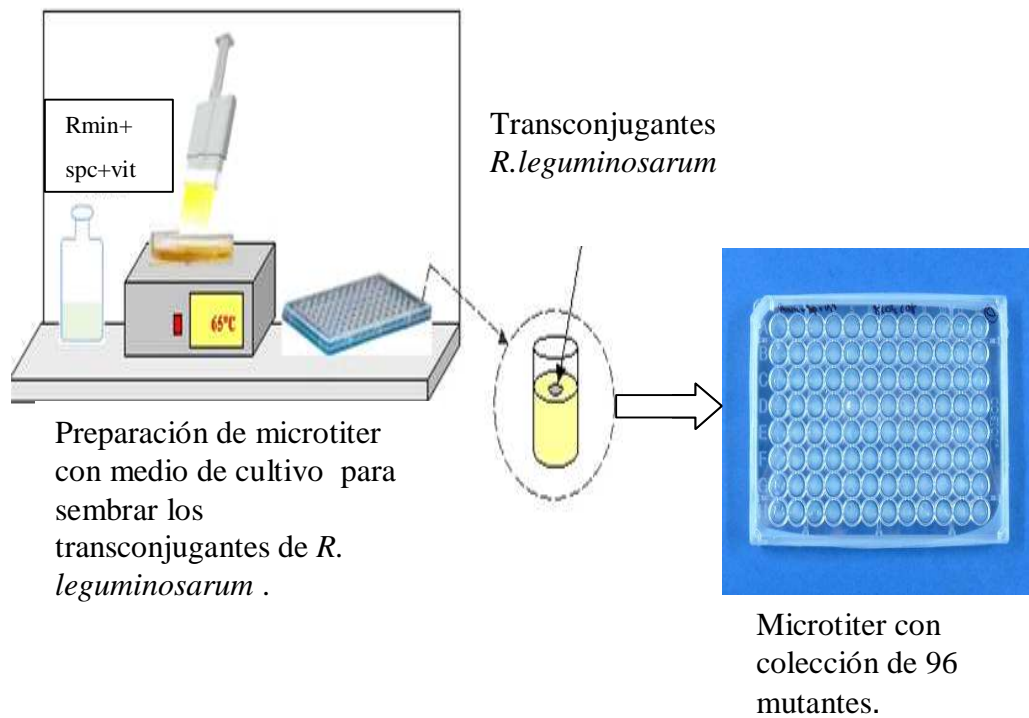


Figura 4. Preparación de placas microtiter con medio e inoculación de los transconjugantes.

11.2. Obtención de lotes de ADN.

Se obtuvieron dos tipos de lotes de ADN; lotes de un piso completo (576 colonias) y lotes de filas x columnas de cada piso correspondientes (48 colonias). Para obtener los lotes de ADN se sembraron los clones de los microtiter en placas cuadradas con medio Rmin con espectinomicina utilizando “peines” con 96 puntas para hacer copias completas del microtiter y “peines” con 8 y 12 puntas para obtener copias de los lotes de colonias de filas por columnas. Los peines se esterilizan flameando varias veces el peine tras introducirlo en placas con alcohol puro.

Para obtener el ADN total de un piso de la mutateca, se extrajo de manera separada el ADN de cada una de las 6 placas cuadradas con medio Rmin siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.1. Cada placa contiene una copia de las 96 colonias que se encuentran en cada una de los 6 microtiter que componen un piso. Posteriormente se mezcló el ADN obtenido de cada placa obteniéndose un lote de ADN del piso completo (ADN perteneciente a 576 colonias).

Esta misma operación se realizó sembrando de forma separada en placas cuadradas las colonias pertenecientes a una fila y a su correspondiente columna, obteniéndose lotes de ADN de las 24 filas y 24 columnas de cada uno de los pisos.

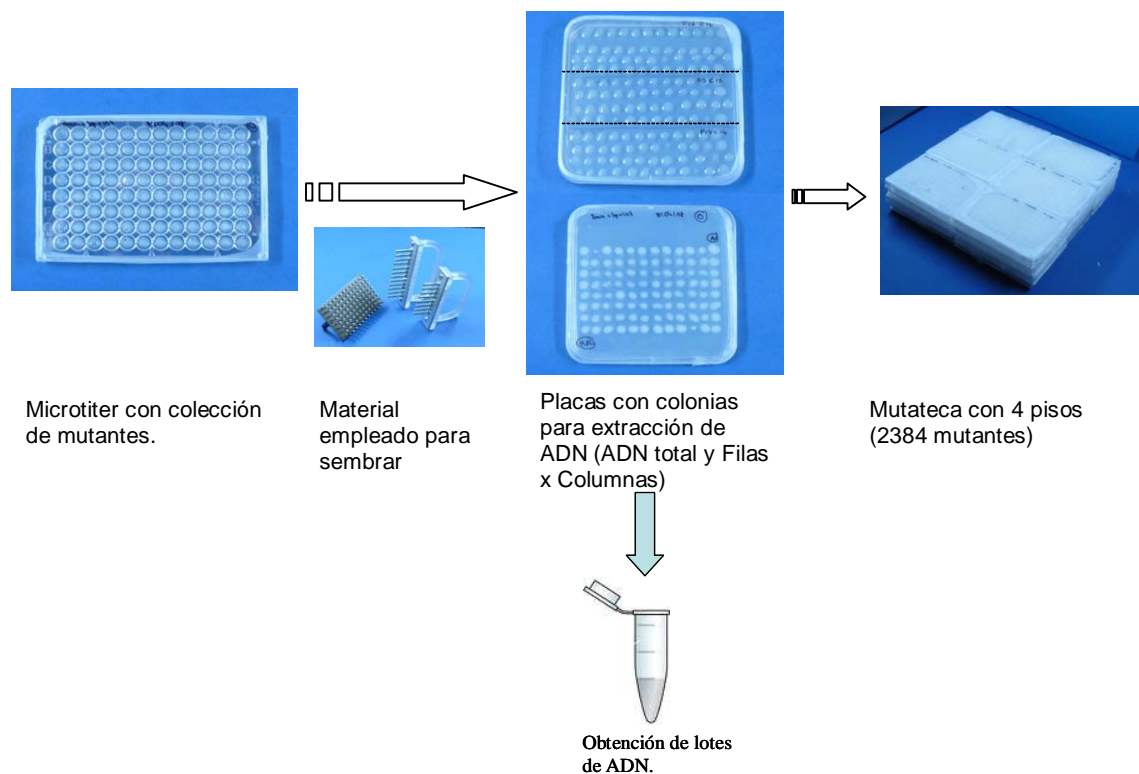


Figura 5. Obtención de lotes de ADN de colonias organizadas en pisos con 6 placas de microtiter.

11.3. Conservación de clones y ADN.

Los microtiter se conservaron congelados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Previamente se añadió medio Rmin líquido con espectinomicina y con un 20% glicerol a cada pocillo (100 μl aproximadamente cada uno), se mezcló con ayuda de una micropipeta, se dejó crecer durante 1 día para recuperar los clones y se congelaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su conservación. Los lotes de ADN se conservaron también congelados a -70°C en tubos eppendorf. Estos lotes se utilizaron posteriormente en pruebas de PCR para buscar clones de interés en la mutateca.

11.4. Metodología empleada para la localización de mutantes en la mutateca.

En primer lugar se realizaron reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos de genes de interés más los oligos del minitransposón aadA1846 y 0end con el lote de ADN perteneciente a cada uno de los 4 pisos completos de la mutateca. Una amplificación positiva indicaría un posible mutante en un gen correspondiente a lo oligonucleótido específico empleado.

Una vez identificado el piso con una amplificación positiva, se realiza un segundo ensayo de PCR con los lotes de ADN de cada fila por su columna del piso correspondiente, de manera que se realizan un total de 24 reacciones de PCR por cada piso (24 lotes ADN de filas por columnas y cada uno de los lotes con cada oligonucleótido de la pareja y los del minitransposón).

En un principio cabe esperar al menos dos amplificaciones positivas, una en la fila en la que se encuentra el mutante x su columna correspondiente y otra en la columna en la que se encuentra por su fila correspondiente.

Finalmente se analizan por PCR individualmente los dos posibles candidatos.

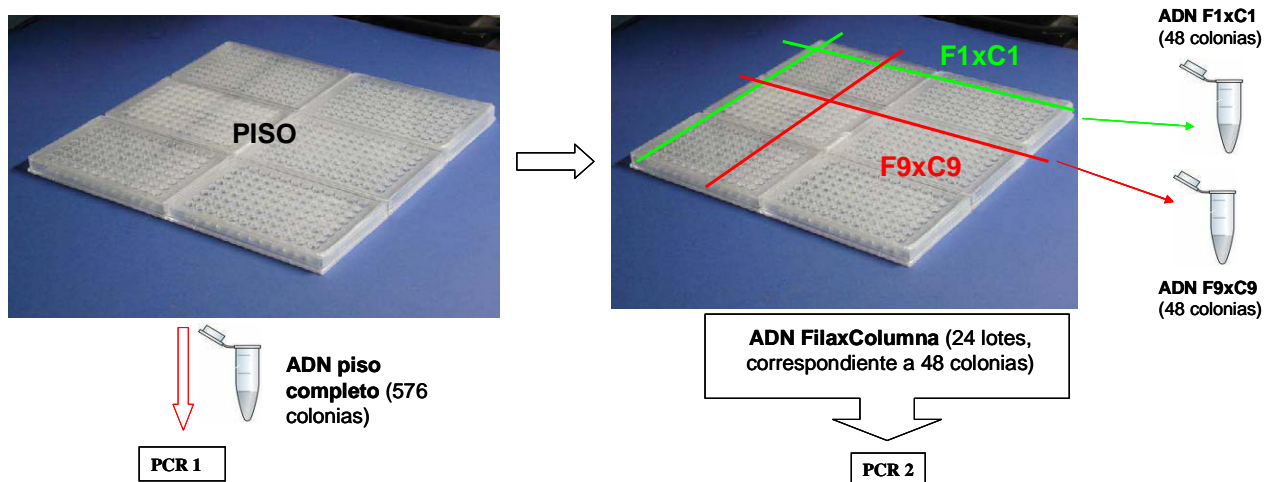


Figura 6. Esquema del método empleado para la localización de mutantes.

PCR 1. PCR con 4 ADN de cada piso (596 colonias) amplificado con un oligonucleótido específico y Oend y aadA1846.

PCR 2. PCR con 24 lotes de ADN de filas x columnas (48 colonias), lote correspondientes a un piso con amplificación positiva. En caso de un mutante específico cabría esperar dos bandas, por ejemplo amplificación en la F1xC9 ó F9xC1.

V RESULTADOS

1. GENERACIÓN DE MUTANTES.

En el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas participan numerosas proteínas de localización extracitoplásmica. El sistema Tat es un sistema de translocación de proteínas del que, en *Rhizobium leguminosarum*, dependerían potencialmente 102 proteínas (Jiménez A., 2006). El sistema Tat es esencial para la simbiosis. En nuestro laboratorio estamos interesados en conocer la función de estas proteínas y en particular las denominadas de unión a sustratos periplásmicos, ya que suponen el grupo más numeroso de proteínas Tat-dependientes. En este contexto se pretende poner a punto una metodología para identificar mutantes en proteínas Tat-dependientes a partir de una colección de mutantes o mutateca. Para el estudio del genoma de las bacterias a menudo se construyen mutatecas como herramienta de trabajo, que permiten obtener una colección de mutantes entre los que buscar mutaciones en genes de interés. Para obtener los mutantes es frecuente la utilización de transposones que se insertan en el genoma de la bacteria de manera aleatoria. Este método se ha utilizado entre otros, en estudios sobre *Vibrio cholerae* (Cameron et al, 2008) y sobre *Mycoplasma pulmonis* (French et al, 2008).

Para construir nuestra mutateca se llevó a cabo una mutagénesis aleatoria mediante un minitransposón contenido en el plásmido pSS240. El minitransposón empleado además del gen de resistencia a espectinomicina, contiene el gen *gusA* y un origen de replicación en *E. coli* (*oriV*) (Di Gregorio et al, 2004).

La identificación de mutantes se abordó mediante la técnica de PCR, buscando ampliaciones de bandas menores a 2 kb a partir de ADN de diferentes lotes de mutantes y utilizando cebadores específicos del transposón y de la secuencia de ADN adyacente al gen de interés.

1.1. Selección de mutantes control.

Con objeto evaluar el número de mutantes que se podrían analizar conjuntamente mediante una reacción de PCR, inicialmente se realizó una amplificación a partir de lotes de ADN de 288 colonias y posteriormente de 576 colonias. Con objeto de

comprobar que el método empleado permitiría identificar un mutante entre 288 o 576 colonias, se seleccionaron dos mutantes control. Los mutantes control se eligieron seleccionando al azar seis cepas aisladas de rizobios resistentes a espectinomicina obtenidos por conjugación como se ha indicado anteriormente. La localización de la secuencia de la inserción del transposón en esas cepas se realizó aislando el ADN total de cada cepa, que se cortó con el enzima de restricción *Pst* I (que no corta en el minitransposón), se ligó con Ligasa y se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α . Se seleccionaron colonias de *E. coli* resistentes a espectinomicina de las que se aisló ADN plasmídico y se secuenció el ADN adyacente al transposón utilizando el oligonucleótido aadA1846.

El análisis de la secuencia permitió identificar la localización de la transposición de seis mutantes. Se eligieron dos de ellos como controles, cada uno con el minitransposón en una orientación diferente: mutHupF y mutRL1960 (ver Fig. 7). A partir de las secuencias de HupF y RL1960 y regiones flanqueantes se diseñaron oligonucleótidos que permitieron amplificar por PCR un fragmento de ADN comprendido entre el minitransposón y la región de ADN adyacente. Para esta amplificación se emplearon también oligonucleótidos correspondientes a los extremos de minitransposón.

Genoma de *Rhizobium leguminosarum* portador del transposón en el gen RL3370 (**mutRL1960**)

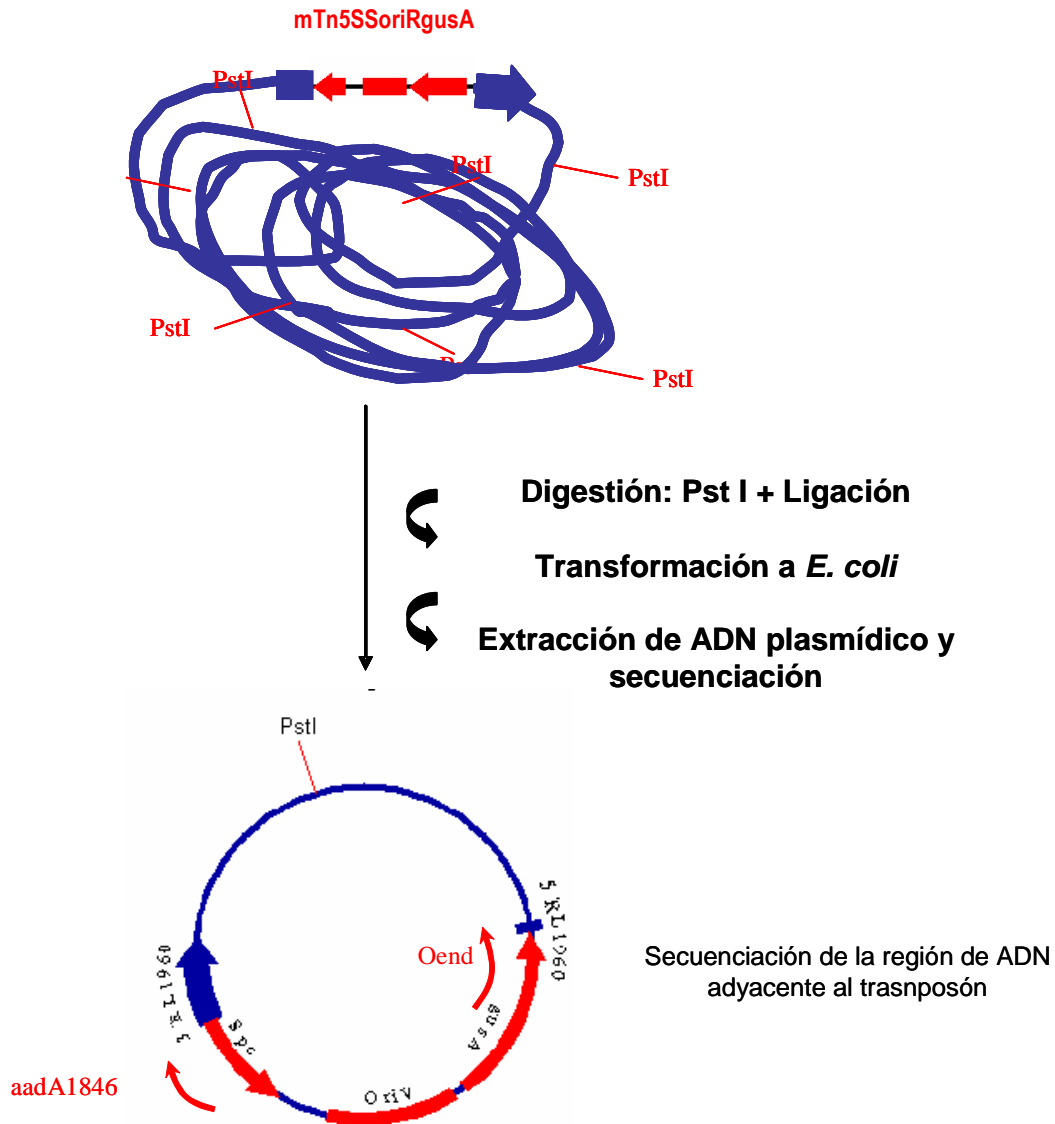


Figura 7. Localización de la secuencia de la inserción del transposón en el mutante mutRL1960 de *R. leguminosarum* UPM791. Estrategia para localizar la inserción del transposón.

2. MUTANTES OBTENIDOS Y ORGANIZACIÓN DE LA MUTATECA.

En este trabajo se han ordenado un total de 2.304 mutantes organizados en cuatro pisos de 24 x 24. Un piso se compone de seis placas microtiter que contienen medio sólido Rmin con espectinomicina en cada pocillo.

Utilizando la fórmula de probabilidad $N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-f)}$ (Sambrook y Russell 2001) y teniendo en cuenta las consideraciones indicadas en el apartado 2.3 de Materiales y Métodos, se estimó que la probabilidad de encontrar una inserción en un gen determinado entre los mutantes de los cuatro pisos es del 27,18%.

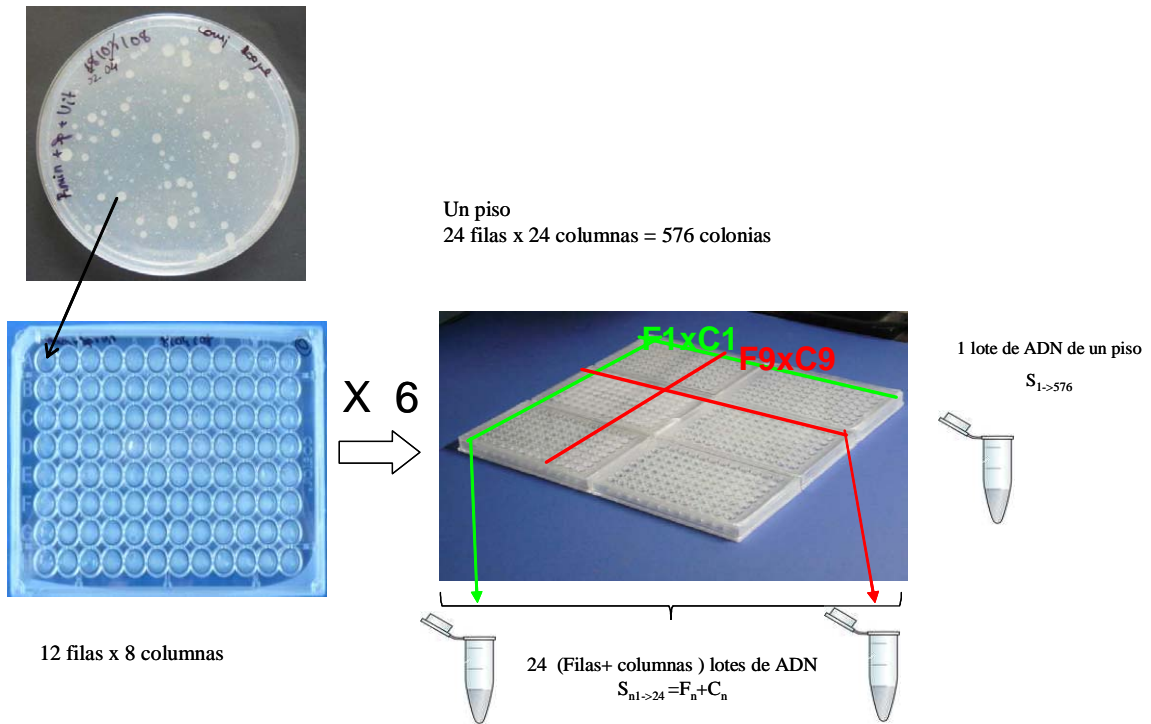


Figura 8. Esquema de la organización de la mutateca de *Rhizobium leguminosarum* y obtención de lotes de ADN. Por cada piso, se obtuvieron 25 lotes de ADN correspondientes al piso completo y 24 correspondientes a la suma de las colonias de cada fila y columna correspondiente.

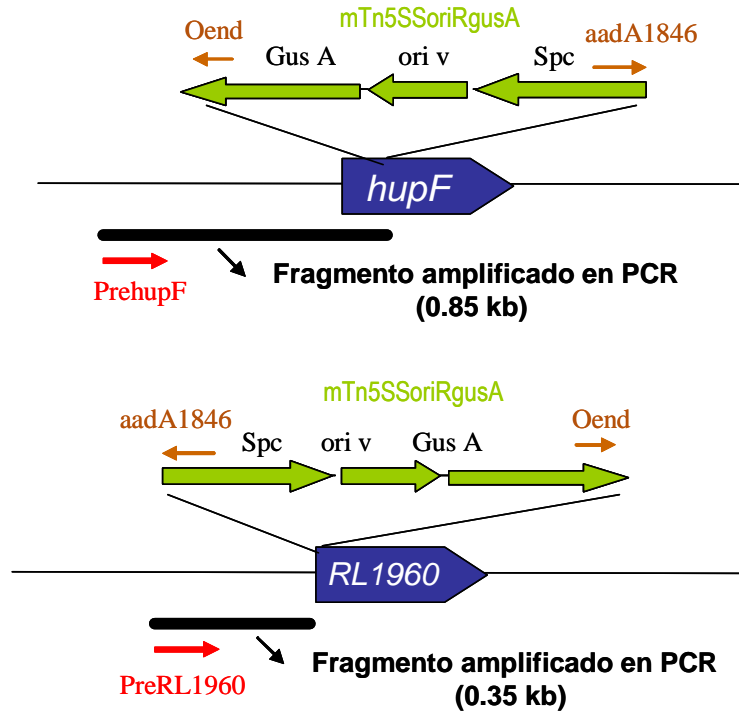
3. IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES CONTROL A PARTIR DE DIFERENTES LOTES DE ADN.

La técnica elegida para identificar mutaciones en genes de interés a partir de la mutateca fue la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction). Mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos correspondientes a la región adyacente al gen de interés y correspondientes al transposón, se obtendrían bandas específicas de amplificación sólo si la inserción del transposón se localizaba entre los oligos que delimitan al gen de interés. Además, considerando las dos posibles orientaciones en que puede orientarse el transposón, para optimizar la PCR, se utilizó siempre un oligonucleótido específico y dos oligos de los extremos del transposón y en orientación opuesta (ver Fig 9).

Para comprobar si mediante PCR a partir de lotes de ADN de diferente número de colonias era posible identificar un mutante control, se seleccionaron dos: mutHupF y mutRL1960. Para seleccionar los mutantes control se eligieron dos de ellos al azar y se localizó la inserción (ver apartado 10 de Materiales y Métodos). Se diseñaron oligos en las regiones adyacentes al punto de inserción.

Se prepararon lotes de ADN de 288 colonias (medio piso) y 576 colonias (piso completo) entre los que se encontraban incluidos los controles. Los resultados de la amplificación utilizando los oligonucleótidos de los mutantes control se indican en la figura 9B y muestran que, a partir de la metodología seguida, se identificó la presencia de una banda de amplificación de 0,35 kb correspondiente al mutante designado mutRL1960 en un lote de ADN procedente de 576 colonias. El fragmento amplificado pertenece a la región delimitada por los oligonucleótidos preRL1960 y aadA1846. Con el mutante control mutHupF, se usó la misma metodología que en caso del control mutRL1960, pero sólo se consiguió obtener una amplificación de una banda de 0,85 kb cuando se utilizó un lote de ADN de 288 colonias (ver figura 9.B).

A.



B.

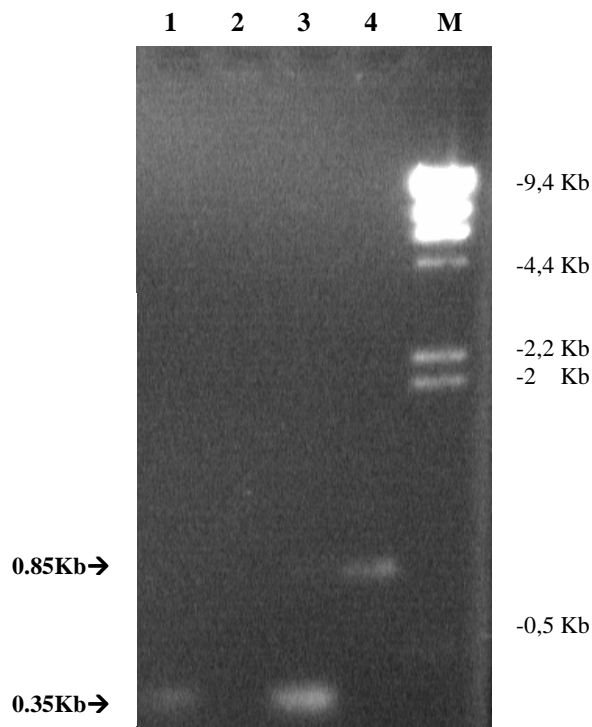


Figura 9. Amplificación de ADN adyacente al transposón insertado en los mutantes control *mutHupF* y *mutRL1960*. A) El fragmento de ADN amplificado entre el oligo *preHupF* y *Oend* del transposón tiene un tamaño de 0,85 Kb. El fragmento de ADN amplificado en el caso del *mutRL1960* tiene un tamaño de 0,35 Kb. B) Electroforesis en gel de agarosa al

1%. Carriles 1, 2, 3 y 4: Amplificación a partir de ADN de lotes de colonias entre las que se encuentran los mutantes control. Carril **1**. ADN de 576 colonias (oligos utilizados preRL1960, aadA1846 y 0end). Carril **2**. ADN de 576 colonias (oligos preHupF, aadA1846 y Oend). Carril **3**. ADN de 288 colonias (oligos como en 1). Carril **4**. ADN de 288 colonias (oligos empleados aadA1846, Oend, preHupF y preRL1960).

4. LOCALIZACIÓN DE MUTACIONES EN GENES QUE CODIFICAN PARA PROTEÍNAS Tat-DEPENDIENTES.

Una vez probada la identificación de los mutantes control a partir de un lote de ADN de 576 colonias, se inició la búsqueda de mutantes en un pequeño grupo de genes. Estos genes fueron: pRL100348, pRL100337, RL3370, pRL9020, y RL4142 que codifican para proteínas periplásmicas Tat-dependientes, y que fueron identificadas mediante análisis proteómico en un trabajo anterior (Jiménez, A., 2006). Se diseñaron dos oligonucleótidos correspondientes a regiones de ADN a aproximadamente 0,5 kb distantes a ambos lados de cada gen. Las secuencias de los oligonucleótidos se incluyen en la Tabla 3 de Materiales y Métodos. La presencia de una banda específica de más de 0,5 kb indicaría la posibilidad de que en el lote de ADN que se está analizando hubiera ADN con una mutación en el gen de interés.

Para cada ensayo de PCR se utilizaron 3 oligonucleótidos: dos pertenecientes al transposón (aadA1846 y 0end) y uno de los dos diseñados para cada gen.

4.1. Localización de inserciones en genes de interés.

En un primer ensayo de PCR, se probaron 5 parejas de oligonucleótidos correspondientes a los genes pRL100348, pRL100337, RL3370, pRL9020, y RL4142 y el ADN de cada uno de los 4 pisos, es decir, un total de 40 reacciones de PCR diferentes. Se obtuvo una amplificación en la reacción con el oligonucleótido U3370-W5 y el ADN de los mutantes del piso 2 de la mutateca. A continuación se realizó un segundo ensayo de PCR en la que se utilizaron los 24 lotes de ADN de filas por columnas del piso 2, con los oligos U3370-W5 y L3370-W3 más los oligos del transposón, un total de 48 reacciones de PCR. En el gel de agarosa se observaron dos bandas de igual tamaño (2,2 kb): una banda en la reacción realizada con el lote de ADN

de la fila 8 por columna 8 y en la reacción con ADN de la fila 13 por columna 13. Con objeto de comprobar si la mutación en el gen *RL3370* corresponde a la posición de la mutateca Fila 8 x Columna 13 ó Fila 13 x Columna 8, se crecieron ambos candidatos para su extracción de ADN. Por último, se realizó una reacción de PCR con el ADN de los dos candidatos y con los oligonucleótidos U3370, L3370, U3370-W5 y L3370-W3 . Se obtuvo un resultado positivo para el mutante de la fila 8-columna 13 y el oligo U3370.

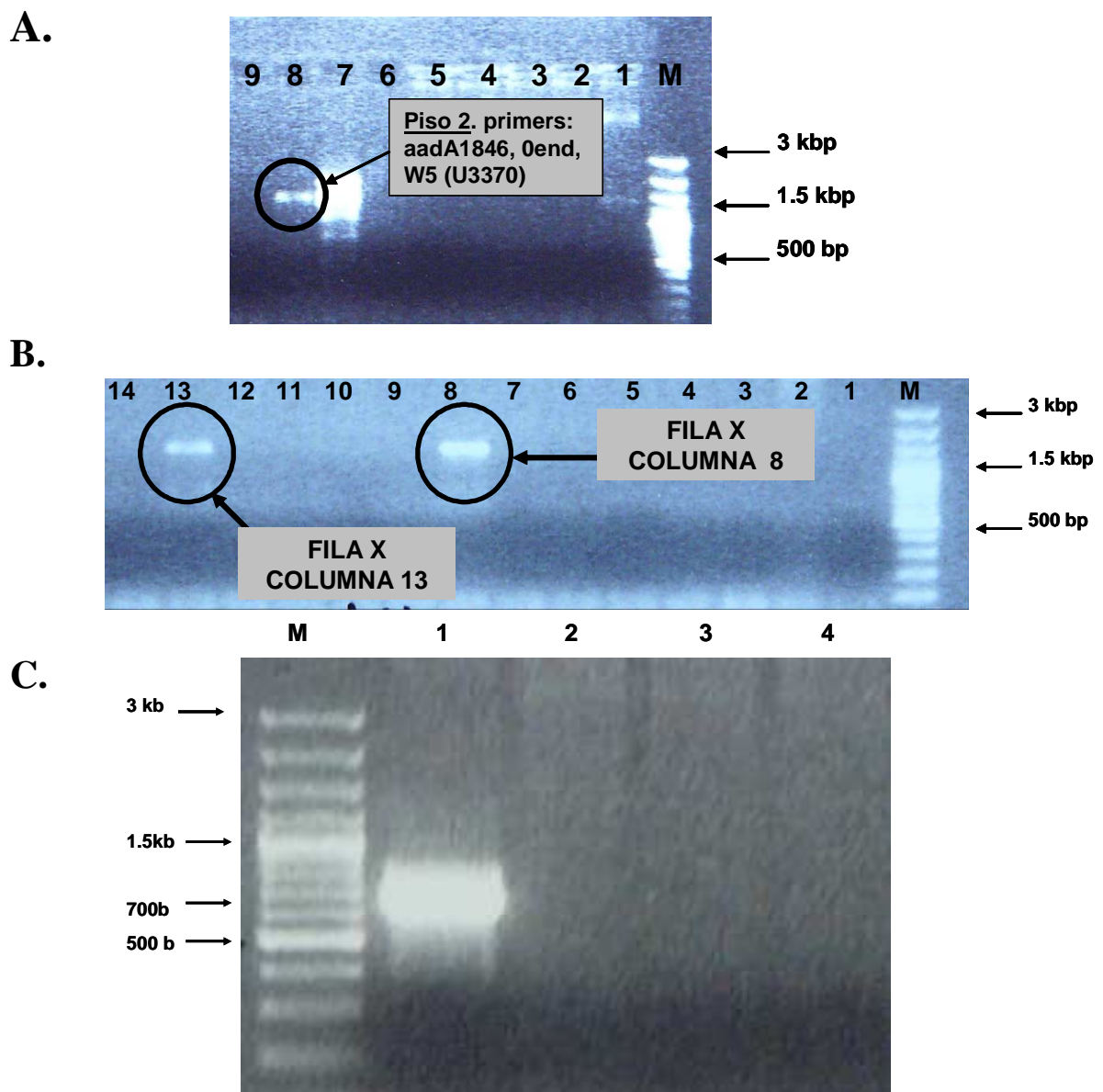


Figura 10. Identificación mediante PCR de una inserción en el gen *RL3370*. A) Electroforesis de bandas de ampliación obtenidas con reacciones de PCR utilizando los diferentes oligonucleótidos específicos y los oligos del transposón *aadA1846* y *0end* y el ADN

de cada uno de los 4 pisos de la mutateca. Con un círculo se indica una banda de amplificación correspondiente a la región con la inserción en el gen *RL3370*. M: Marcador. **B)** Carriles 1-14: PCR de lotes de ADN de 48 colonias correspondientes a fila x columna del mismo número. Oligonucleótidos utilizados en todos los carriles: U3370, Oend y aadA1846. **C)** Amplificación del ADN de los candidatos a tener interrumpido el gen *RL3370*. Carriles 1-3: ADN de la colonia en la Fila 8 – Columna 13 y carriles 4-6: ADN de la colonia en la Fila 13 – Columna 8. Oligonucleótidos empleados: carriles 1 y 4: U3370, carril 2: L3370, carril 3: U3370-W5. Carriles 1-6: aadA1846 y Oend. M: marcador 100 pb. Las flechas indican el número de bases de las diferentes bandas del marcador.

En esta ocasión sólo se consiguieron obtener amplificaciones con el oligonucleótido U3370-W5 (ver figura 10A y 10B) obteniéndose una la banda de amplificación de 1.2 bases aproximadamente y otra con el oligo U3370 en las reacciones de PCR con el ADN del mutante mutRL3370 obteniendo una banda de 0,67 bases aproximadamente. A continuación se buscó la confirmación por secuenciación procediéndose primero a clonar el transposón y la región adyacente tal como se ha indicado para las mutaciones en los genes *RL1960* y *HupF* (ver figura 7).

La comparación de la secuencia adyacente al transposón obtenida frente el banco de datos “GenBank” mediante el algoritmo BLAST, reveló que la inserción en el mutante se localizaba en la base 1183 a partir del codón de iniciación del gen *RL3370* de *R. leguminosarum bv viciae* (ver figura 11). Una vez localizada la inserción y la secuencia, a la cepa mutante correspondiente de *Rhizobium leguminosarum bv viciae* se la denominó mutRL3370.

La secuencia permitió localizar la posición de la inserción del transposón en el gen, así como la orientación del mismo. El gen *gusA* del transposón se orienta en sentido contrario a la expresión de RL3370 (Fig 11). La posición de la inserción es compatible con el tamaño obtenido en la amplificación de las reacciones por PCR al utilizar los oligonucleótidos U3370 y U3370-W5 del gen y aadA1846 y Oend del transposón (Ver figura 11).

5. ANÁLISIS DEL GEN *RL3370*.

El gen *RL3370* según la organización presente en la base de datos “Rhizobase” (Fig 13) parece formar parte de un operón que codifica para un transportador tipo ABC, homólogo a transportadores implicados en el transporte de poliaminas a través de la membrana plasmática utilizando como energía la hidrólisis de ATP. El gen *RL3370* codifica la proteína *RL3370* que es homóloga a la proteína PotD de *E. coli* y corresponde a proteínas periplásmicas de unión a sustrato.

La similitud de aminoácidos de la proteína *RL3370* entre las cepas UPM791 y 3841 es del 95% y de un 97 % si consideramos cambios conservativos de aminoácidos (ver Figura 14).

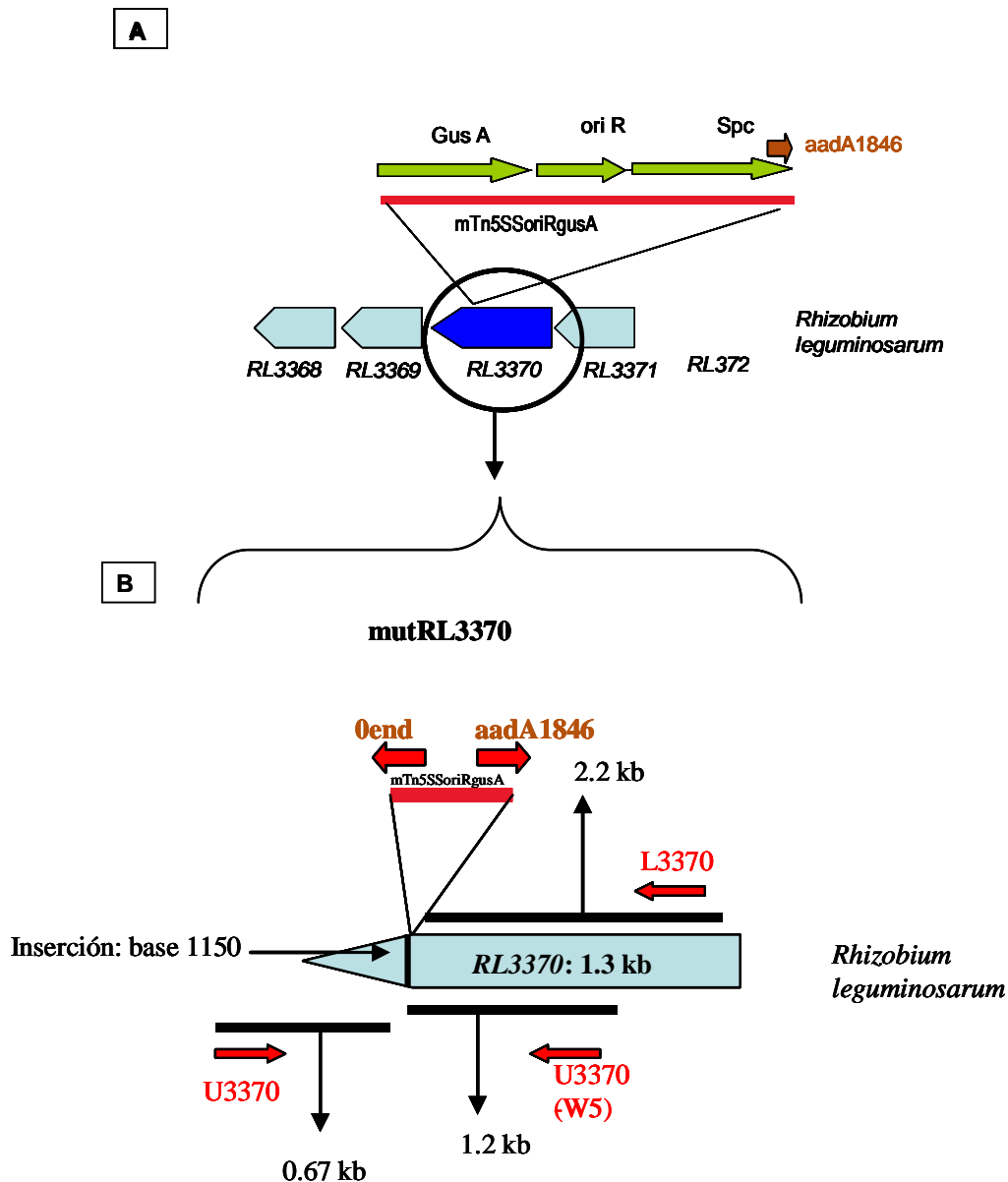


Figura 11: Localización de una inserción en el gen *RL3370* de *Rhizobium leguminosarum*.
A) Organización de la región de ADN que incluye el gen *RL3370* y localización de la inserción del minitransposón en el mutante *mutRL3370*. *aadA1846* corresponde a la posición del oligonucleótido del transposón utilizado para secuenciar la región adyacente a la inserción. **B) Detalle de la región analizada.** *aadA1846* y *0end* son los oligos del transposón. En rojo se indican los oligos específicos utilizados. Las líneas en negro representan fragmentos de ADN que se amplificarían con los oligonucleótidos *U3370*-*W5* con *aadA1846* y *U3370* con *0end* presentados en la Figura 10.

GCATCACCTTCGTGCACGTTACCCATAGCCAGGAAGAGGCGATGGCGCTCGCCGACGTCATCGTCATCATGAATGAGTC
GGATCGAGCAGGCGGCCGCCCGCGGAGGTCTTCGAACGGCCGGCGACTGCCTTCGTGCGCGCTTCATGGGCGACCA
CAATGTGCTGTCCGGCCGGGTGACTTTCGAGCGAGAACGGCGTGTCTCGTCATGACCGTGCCGGAAGGGCAGAGCTTTTCC
GTGCGCGGGACGGACAGGGAGGTGCGGCGAGCCTGTGATATCGGTATCCGCACCGACCGCGTGGCCCTACAGGTGGCGA
CCGAATGGACGCTCGGCTTCGACGGCATCGTCTCCAACATCGAATATCGCGGCTCTTCCGTGAAGATCACCGTTATCGG
CGCGGAAGCGACGATTTACCCTGATTGCCGACGACGGCGACTATTTCCGCCGGCCGGTGGCCGTGGCGACACCGTC
TCGCTCAGCTGGGCGCTCGAAGATGCCGTGCTTCTCGGCCGTCTTCCGCATGAGCCATCACCATCAAGAACACTGAAC

→ W5

CACTGAACCTTCTATCCAAGAAAAGGGGAACTGAC ATG ACG ACT GAA ACG ACA TCG ACC AAA GCG GAG 666
M T T E T T S T K A E 11

AAG GGA CTT TCC CGT CGC ACG CTG CTG AAG ACG GGT GCT GCC GCC GTC GGC GCC ATC GCC
K G L S R R T L L K T G A A A V G A I A
GGC TCC GGC ACC ATC ACC GGC TTT CCC ACA ATC TGG GCG CAG ACG AAC ATC ACG CTT CGC
G S G A I T G F P T I W A Q T N I T L R
CAG TTC GGC ACC GGC GTT TCG AAC ATC AAT GCC ATC GCC GAG AAG TGC AAG GCC GAT CTT
Q F G T G V S N I N A I A E K C K A D L
GGC ATC ACG CTG GAG ATG ACG GCA ACC GAT TCC GAC GCC GCC GCC CAG CGC GCC GTC ACC
G I T L E M T A T D S D A A A Q R A V T
CAG CCC GAC AGC TAT GTG GAG GCG GGT TCC AAG AAG TAC TGG ATC GCC AAG AAG GTG TFC CCG
Q P D S Y D I A D I E Y W I A K K V FF P
ACC GGC GTC ATG CAG CCG ATG GAC GTC AAG AAG CTG AAA TAT TAC GAC AAG ATC GTG CCG
T G V M Q P M D V K K L K Y Y D K I V P
CTG TTC ATC AAC GGC AAG CTG AAG CCG GAA AGC GTC ATC GCC CAG GGT ACG GCG CCG CAC
L F I N G K L K P E S V I A Q G T A P H
ACG GTC GGC TTC GTG GAG GCG GGT TCC AAG AAG TTC GCC AAG GAG CCG ACG CAG TGG
T V G F V E A Q G S K K F A K E P T Q W
ATG ACG ATG GTT CCG ACC ATC TAC AAC GCC GAT ACG CTT GGT ATT CGC CCC GAC CTC ACC
M T M V P T I Y N A D T L G I R P D L T
GGC CGT CCG ATC ACC AGC TGG GCC GAT ATT CTC GAT CCG GCC TTC AAG GGC AAA ACC GCG
G R P I T S W A D I L D P A F K G K T A
ATC CTC AAC ATC CCG TCG ATC GGC ATC ATG GAT GCG GCG ATG ATC ATG GAA GCC TCC GGC
I L N I P S I G I M D A A M I M E A S G
AAG ATC AAA TAT GCC GAC AAG GGC AAC ATG ACG AAG GAA GAA ATC GAC AAG ACG ATC GAC
K I K Y A A D K G N M T K E E I D K T I D
TTC CTG ATC AAG ACC AAG GGT GAC GGT CAG TTC CGT GCC TTC TGG AAG TCG TTC GAC GAA
F L I K T K G D G Q F R A F W K S F D E
AGC GTC AAC CTG ATG GCC TCG AAG GTC GAA GTC ATC CAA TCG ATG TGG TCG CCG GCG
S V N L M A S G E V V I Q S M W S P A V
GCC GCT GTC CGT TCG AAG GGC ATC GCC TGC ACC TTC CAG CCG CTC AAG GAA GGC TAT CGC
A A V R S K G I A C T F Q P L K E G Y R
GCC TGG GGC GGC GGT CTC GGC CTT GCC TCG CAC CTC AAG GGC GCG CAG CTC GAT GCC GCC
A W G G G L G L A S H L K G A Q L D A A
TAT GAA TAC ATC AAC TGG TAC ACG TCG GGC TGG GTC GGC GGC TAC CTC AAC CGC CAG GGT
Y E Y I N W Y T S G W V G G Y L N R Q G

W3 ←

TAC TAT TCC GCC TGC ATG GAC ACC GCC AAG GAA TTC ATG TCG GCC GAC GAA TGG GGC TAC
Y Y S A C M D T A K E F M S A D E W G Y
TGG ATC GAG GGC AAG CCG GCG CAG GGT GAT ATC CTG TCT CCC GAG GGC AAG GTC ATG GAG
W I E K P A Q G D I L S P E G K V M E

AAG GCC GGC GGC GTT CGC GAC ACC GCC GGT TCC TTC GAA GCC CGC ATG GGC GCG GTT GCC TGC
K A G A V R D G G S F E A R M G A V A C
TGG AAC TCC GTC ATG GAC GAG GAC CGC TAC ATG GTC CGT CGC TGG AAC GAG TTC ATC GCT
W N S V M D E D R Y M V R R W N E F I A
GCC TGA TCTCCGACAGAGGGTGGAGAGCCACTGTCTTTGGCGATGCTCAAGACGTGGCTTCGCTCCGCCACTCAC
A *

432

CTGCCCTTCGGGCATCTGACCGGGTTCGACCCACGGGTCTCGACCCGTCCTTTGGACCCCGCTGGGGAGAAGAGGGAG
TTCGCGGTTTGGCCGAGACGAACTGAGGTGCGCGGTGGCTTAGGTGCCCGCGGATTCTTTCTCCTCGCGGGGA
GAAGGTGCCGCGAGGCGGACGAGGGCGGGGCACGAGCCCTCGGTCTGACGCTTACCAATGAGACAACGGAGAACCGG
ATCATGGCGACCATCGCGCGGAAACGGAGGAGGACGGCCAAAGGCGCGCGGGCGGGCGGACTGAGGCTTTCCCAT
CGCGGATATCCTATCTCAGGGACGCCGTGTTCGTCAATCTCGGCTTCTTCTTCTGCTGCCGATCGCCATGATCGG
CGTCGTCAGCTTCTGGGACTACGATTTTGGCGTCTCTATCCCGATTTCTGACAATGA
U3370 ←
ACTACACCGACACGCTCGGT
TCGTGGGTGACGTGGAAGACCTATCTTAACACCTTGAATCACTGCGTGTCTGGTTCGCTGACGCTCGTCATCGGCTT
CTGGGTGCGCTATTTCTTGGCCTTCCACATTCGCAAGACTTCGACGACAGATGATCCTCTTCTCCTGCTGACCGTGCCG
TTCATGACGTCGAACATCATCCGCATGATCTCGTGGATCCCGGTGCTCGGGCGCAACGGCCCTGGTCAATTCGACGCTGA
TCAATATGGGTATCATCCCCAAGCCGATCGAATGGCTGCTCTATTCCGATTTTCGCTGCTGCTCGCCATGGTGCATCT

Figura 12 . Secuencia de la región de ADN de *R. leguminosarum* UPM791 que comprende el gen ortólogo a RL3370 de *R. leguminosarum* 3841 (RL3370-UPM791). En verde se indica la secuencia aminoacídica correspondiente al gen RL3370 de UPM791. En rojo la posición de oligos utilizados en reacciones de PCR, su designación y orientación. Con la flecha vertical se indica el lugar donde se ha insertado el minitransposón.

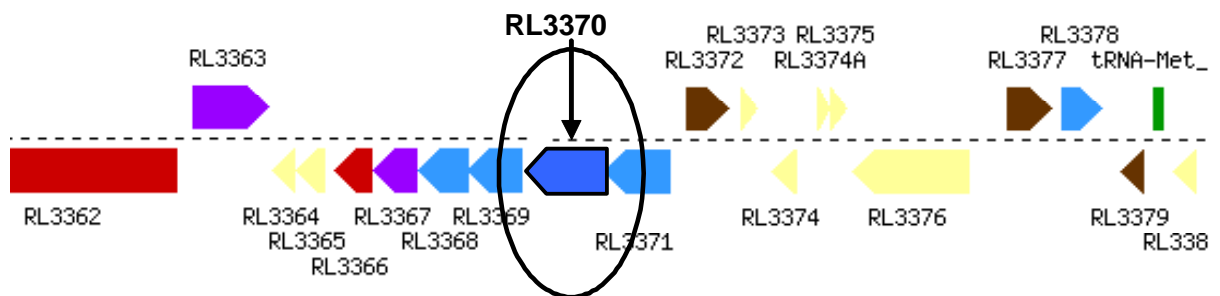


Figura 13. Organización de la región de ADN que contiene el gen *RL3370* en el genoma de *Rhizobium leguminosarum* *bv viciae* 3841. En azul aparecen genes que forman parte de un sistema ABC. Figura obtenida de Rhizobase (<http://bacteria.kazusa.or.jp/rhizobase/>).

UPM791: MTTETTSTKAEKGL**SRR****TL**LK**T**GAAAVGAIAGSGAITGFPTIWAQTNITLRQFGTGVSNI 60
 MTTETTSTKAEKGLSRR LLKTGAAAVGAIAGSGAITGFPTIWAQTNITLRQFGTGVSNI
 3841 : MTTETTSTKAEKGL**SRR****AL**LK**T**GAAAVGAIAGSGAITGFPTIWAQTNITLRQFGTGVSNI 60

 UPM791: NAIAEKCKADLGITILEMTATDSDAAAQRAVTQPDSYDIADIEYWIAKKVFPT**GVM**QPMDV 120
 NAIAEKCKADLGITILEMTATDSDAAAQRAVTQPDSYDIADIEYWIAKKVFPT V+QPMDV
 3841: NAIAEKCKADLGITILEMTATDSDAAAQRAVTQPDSYDIADIEYWIAKKVFPT**SVL**QPMDV 120

 UPM791: KKLKYYDKIVPLFINGK**L**KPESVIAQGTAPHTVGFVEA**Q**GSKKFAKEPTQWMTMVPTIYN 180
 KKLKYYDKIVPLFINGK+KPESVIAQGTAPHTVGFVEA**Q** SKKFAKEPTQWMTMVPTIYN
 3841 : KKLKYYDKIVPLFINGK**M**KPESVIAQGTAPHTVGFVEA**Q**DSKKFAKEPTQWMTMVPTIYN 180

 UPM791: ADTLGIRPDL**T**GR**P**ITSWADIL**D**PA**F**KGK**T**A**I**LNIPSIGIMDAAMIMEA**S**G**K**IKYADKGN 240
 ADTLGIRPDL GR ITSWADI+DP FKGKT+ILNIPSIGIMDAAMIMEA G IKYADKGN
 3841 : ADTLGIRPDL**V**GR**D**ITSWADIM**D**PK**F**KGK**T**S**I**LNIPSIGIMDAAMIMEA**M**G**N**IKYADKGN 240

 UPM791: MTKEEIDK**T**ID**F**L**I**K**T**KG**D**G**Q**F**R**A**F**W**K**S**F**D**E**S**V**N**L**M**A**S**G**E**V**V**I**Q**S**M**W**S**P**A**V**A**A**V**R**S**K**G**I**A 300
 MTKEEIDK**T**I+**F**L**I**K**T**KG**D**G**Q**F**R**A**F**W**K**S**F**D**E**S**V**N**L**M**A**S**G**E**V**V**I**Q**S**M**W**S**P**A**V**A**A**V**R**S**K**G**I**A 300
 3841 : MTKEEIDK**T**I**E**F**L**I**K****A**KG**D**G**Q**F**R**A**F**W**K**S**F**D**E**S**V**N**L**M**A**S**G**E**V**V**I**Q**S**M**W**S**P**A**V**A**A**V**R**S**K**G**I**A 300

 UPM791: **C****T****F**Q**P**L**K**E**G**Y**R**A**W**G**G**L**G**L**A**S**H**L**K**G**A**Q**L**D**A**A**E**Y**E**I**N**W**Y**T**S**G**W**V**G**G**Y**L**N**R**Q**G**Y**S**A**C**M**D**T**A 360
 C +Q**P**L**K**E**G**Y**R**A**W**G**G**L**G**L**A**S**H**L**K**G**A**Q**L**D**A**A**E**Y**E**I**N**W**Y**T**S**G**W**V**G**G**Y**L**N**R**Q**G**Y**S**A**C**M**D**T**A
 3841 : **C****K****Y**Q**P**L**K**E**G**Y**R**A**W**G**G**L**G**L**A**S**H**L**K**G**A**Q**L**D**A**A**E**Y**E**I**N**W**Y**T**S**G**W**V**G**G**Y**L**N**R**Q**G**Y**S**A**C**M**D**T**A 360

 UPM791: KEFMSADEWGYWIEG**K****P**A**Q**G**D**I**L**S**P**E**G**K**V**M**E**K**A**G**A**V**R**D**G**G**S**F**E**A**R**M**G**A**V**A**C**W**N**S**V**M**D**E**D**R 420
 KEFMSADEWGYWIEG**K** A G**D**I+**S**P**E**G**K****V**M**E**K**A**G**A**V**R**D**G**G**S**F**E**A**R**M**G**A**V**A**C**W**N**S**V**M**D**E**D**R
 3841 : KEFMSADEWGYWIEG**K****A****A****T**G**D**I**M**S**P**E**G**K**V**M**E**K**A**G**A**V**R**D**G**G**S**F**E**A**R**M**G**A**V**A**C**W**N**S**V**M**D**E**D**R 420

 UPM791: YMVRRWNEFIAA 432
 YMVRRWNEFIAA
 3841 : YMVRRWNEFIAA 432

Figura 14. Alineamiento de la proteína RL3370 de las cepas de *R. leguminosarum* UPM791 y 3841. En rojo se señalan los aminoácidos conservados respecto al motivo consenso de péptidos señal dependientes del sistema Tat. En verde se indican los aminoácidos diferentes entre las dos secuencias.

5.2. Análisis funcional de la proteína RL3370.

Una comparación de la secuencia de la proteína RL3370 con el banco de datos de dominios conservados mostró homología con el dominio COG0687 de proteínas periplásmicas de unión a espermidina/putrescina y con el dominio COG1810 de proteínas periplásmicas de sistemas de transporte de Fe³⁺ tipo ABC (Fig. 16). La proteína PotD de *E. coli* tiene un dominio COG0687 y presenta un 22% de identidad con la RL3370 (ver Figura 17). La proteína potD pertenece a un sistema de transporte ABC descrito en *Escherichia coli* encargado de transporte de poliaminas como la putrescina, espermidina o espermina (Igarashi & Kashiwagi, 2000).

Las poliaminas están ampliamente distribuidas en todos los organismos, aparecen tanto en plantas como en bacterias y existen numerosas evidencias que las relacionan con un gran número de procesos biológicos esenciales (Galston y Sawhney, 1990; Slocum y Flores, 1991). Se ha visto que las poliaminas más comunes: putrescina, espermidina y espermina, regulan la síntesis de proteínas y de ARN (Tabor y Tabor, 1985). Las poliaminas, junto con el magnesio se pueden unir a los polianiones intracelulares para modular sus funciones (Tabor et al, 1985). Algunas poliaminas poco comunes se presentan en ciertos microorganismos como *Physarum polycephalum*, en organismos que habitan en condiciones extremas como bacterias termófilas (que viven bajo condiciones de alta temperatura) tipo *Caldariella acidophila* y en plantas sometidas a estrés osmótico como la alfalfa (Mendoza C & Rocha P.J., 2002).

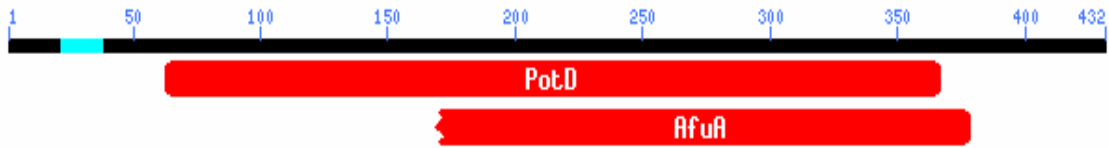
A pesar de estudios intensivos, el rol de las poliaminas y de su transporte en la fisiología de las plantas aún no está claro (Galston y Sawhney, 1990; Slocum y Flores, 1991; Tiburcio *et al.*, 1997). Se ha demostrado que la acumulación de poliaminas está relacionada con el estrés. (Aleti A et al, 2002).

La proteína PotD tiene dos proteínas homólogas en *E.coli*, PotE y PotF. La proteína potD pertenece a un operón de transporte de putrescina y preferentemente de espermidina descrito en *E. coli* W3110 (Igarashi & Kashiwagi, 1999). La proteína PotF muestra una pequeña similaridad a nivel aminoacídico así como una estructura terciaria similar a PotD. Se encontraron 7 aminoácidos conservados en las proteínas PotD y PotF de los 13 aminoácidos que habían mostrado tener importancia en la unión de PotD a su substrato preferente, la espermidina. Estos son: Trp³⁴, Tyr³⁷, Ser⁸³, Glu¹⁷¹, Trp²²⁹, Asp²⁵⁷

y Tyr²⁹³ en *E. coli* (Igarashi & Kashiwagi, 1999). Al comparar la secuencia aminoacídica de PotD con la proteína RL3370 se encontraron 2 aminoácidos conservados de los nombrados anteriormente, concretamente Trp²⁸⁸ y Tyr³⁵⁴ (ver figura 17).

RL3370

A.



S

how Domain Relatives

PSSMs producing significant alignments: Score
(bits) E
value

gnl CDD 10556	COG0687, PotD, Spermidine/putrescine-binding periplasmic prote...	110	3e-25
gnl CDD 11550	COG1840, AfuA, ABC-type Fe ³⁺ transport system, periplasmic com...	37.8	0.002

B.

[gnl|CDD|10556](#) COG0687, PotD, Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein [Amino acid transport and metabolism].

CD-Length = 363 residues, 76.0% aligned
Score = 110 bits (277), Expect = 3e-25

```
Query: 62 AIAEKCKADLGITLEMTATDSDAAA-QRAVTQPDSYDIADIEYWIAKKVFPTSVLQPMDV 120
Sbjct: 46 ALLKPFKETGIKVVYDTFDSNEMLAKLKAGGGGYDVVPSGYFVARLIKEGLLQPLDK 105

Query: 121 KKLKYYDKIVPLFINGKMKPESVIAQGTAPHTVGFVEAQDSKKFAKEPTQWMTMVPTIYN 180
Sbjct: 106 SKLPNWKNLDPEFLNPPKFDPGN--KYSVPYFWGTTGI-----AYN 144

Query: 181 ADTLGIRPDLVGRDITSWADIMDPKFKGKTSILNIPSIGIMDAAMIMEAMGNIKYADKGN 240
Sbjct: 145 TDKVKDAPP-----PTSWADLFDPEKFPGLKGKVALLDDDDREVFGAALLLGK--SPNT 197

Query: 241 MTKEEIDKTIEFLIKAKGDGQFRAFWKSFDESVNLMASGEVVIQSMWSPAVAAVRSKGIA 300
Sbjct: 198 TDPEDLKKAFDLLDKLK---PVNVYWFDGSQYVQLLANGEVVLAMGWSGDAAAKAAKNG 254

Query: 301 CKYQPLKEGYRAWGGGLGLASHLKGAQLDAAYEYINWYTSGWVGGYLNRQGYYSACMDTA 360
Sbjct: 255 APIEFVIPKEGSILWFDNLAIPKGAKNVDAAYKFINFLLDPEVAAKLAEFVGYAPPNKAA 314

Query: 361 KEFMSAD 367
Sbjct: 315 RKLLPKE 321
```

C.

[gnl|CDD|11550](#) COG1840, AfuA, ABC-type Fe³⁺ transport system, periplasmic component [Inorganic ion transport and metabolism].

CD-Length = 299 residues, only 65.9% aligned
Score = 37.8 bits (87), Expect = 0.002

```
Query: 168 PTQWMTMVPTIYNADTLGIRPDLVGRDITSWADIMDPKFKGKTSILNIPSIGIMDAAMI- 226
Sbjct: 80 GGGYVGPLVFAVNTDYN---KDLLKPVPKSWADLAKPEYKGKVQMADPTSSGTAYAALLA 136

Query: 227 MEAMGNIKYADKGNMTKEEIDKTIEFLIKAKGDGQFRAFWKSFDESVNLMASGEVVIQSM 286
Sbjct: 137 LQAYGE-----EKGWAYLKGLAANLA-TYTGGSSSVVAKVVAGGEAAVGLG 181
```


Query: 287 W--SPVAAVRSKGIACKYQPLKEGYRAWGGGLGLASHLKGAQLDAAEYINWYTSGWVG 344
 Sbjct: 182 NLYYGAYAKDKAKGAPVEVVYP E EGTGVNPSGVALLK--KAKNPEAAKLFIDFLLSKEGQ 239

Query: 345 GYLNRRQGYYSAC--MDTAKFMSADEWGYWIEGKAAT 379
 Sbjct: 240 EILAKKGYSP EIPVNPKAEDSPAALDFADLIAALDFET 276

Figura 15. Homología significativa entre la proteína RL3370 de *Rhizobium leguminosarum* *bv viciae* y dominios conservados en agrupaciones de proteínas ortólogas (COG). A. Localización de regiones de homología. B. Alineamiento COG 0687. C. Alineamiento COG 1840. En rojo se indican los aminoácidos idénticos. En azul se indican los cambios conservativos.

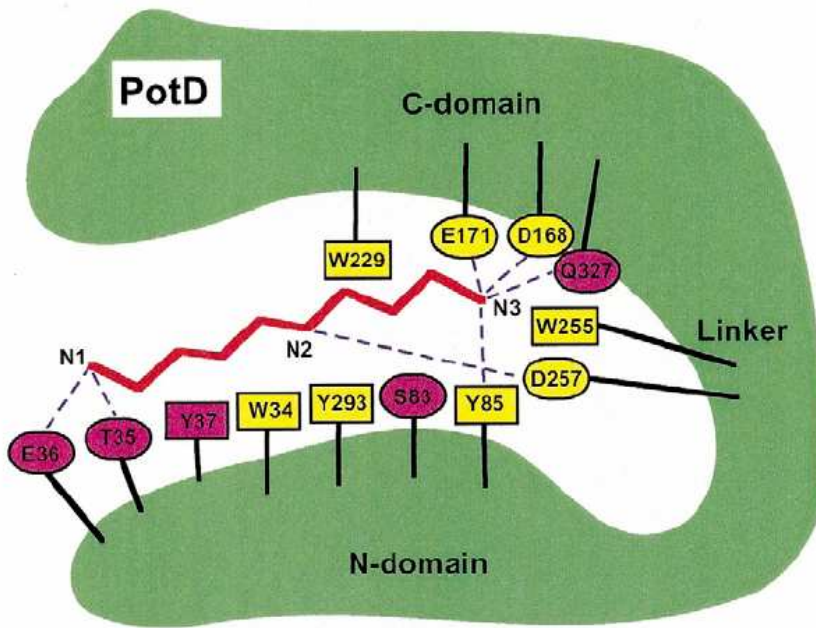


Figura 16. Dibujo esquemático de la proteína potD. Los cuadros en amarillo y morado muestran los residuos importantes en la unión al sustrato. Basado la figura de Igarashi & Kashiwagi, 1999.

```

Rl  MTTETTSTKA EKGLSRRALL KTGAAAVGAI AGSGAITGFP TIWAQTNITL 50
Ec  ..... 29
Consenso ..... .MKKWSRHLL AAGALALGMS AAHADDNNTL
      ..... .mgaaargai AagaaalGmp aahA#dNnTL

r1  RQFGTGVSNl NAIAEKCKAD LGITLMTAT DSDAA..AQR AVTQPDSYDI 98
Ec  YFYNWTEYVP PGLLEQFTKE TGIKVIYSTY ESNETMYAKL KTYKDGAYDL 79
Consenso rq%ntgesni naiaEqcka# LGIklemsat #S#aa..Aqr attqddaYDi

r1  ADIEYWIACK VFPTSVLQPM DVKKLKYDYK IVPLFINGKM KPESVIAQGT 148
Ec  VVPSTYYVDK MRKEGMIQKI DKSKLTFNSN LDPDMLNKPF DPNNDYS... 126
Consenso adietwiadK mrkegmiQki DkkKLn%dn idPdmInGkm dP#ndia...

r1  APHTVGFVEA QDSKKFAKEP TQWMTMVPTI YNADTLGIRP DLVG.RDITS 198
Ec  .....IPYI WGATAIGVNG DAVDPKSVTS 150
Consenso .....!PtI wnAdaiG!rg DaVd.rd!TS

r1  WADIMDPKFK GKTSILNIPS IGIMDAAMIM EAMGNIKYAD KGNMTKEEID 248
Ec  WADLWKPEYK G.....S LLLTDDAREV FQMALRKLGY SGNTTDP... 189
Consenso WADimdPe%K G.....S igimDaArem eaManrKlad kGNmTde...

r1  KTIEFLIKAK GDGQFRAFVK SFDESVNLMA SGEVVIQSMW 288 SPAVAAVRSK 298
Ec  KEIEAAYNEL KKLMPNVAAF NSDNPANPYM EGEVNLGMIW 229 NGSASFVARQA 239
Consenso KeIEaainal gdgqfraaak nFD#paNlma eGEVniqmiW ngaaaaaRqa

r1  GIACKYQPLK EGYRAWGGGL GLASHLKGAQ LDAAYEYINW YTSGWVGGYL 348
Ec  GTPIDVWVWK EGGIFWMDSL AIPANAKNKE ..GALKLINF LLRPDVAQVQ 287
Consenso GiacdyqplK EGgraWgdgL aiaanaKna# ..aAlelINf llrgdVagql

r1  NRQGYYSACM DTAKEFMSAD EWGYWIEGKA ATGDIMSPEG KVMEKAGAVR 354 398
Ec  AETIGYPTPN LAARKLLSPE VANDKTLYPD AETIKNGEWQ NDVGAASSIY 293 337
Consenso arqggYpacn daArel$Sa# eandkiegka Aegdingeeq ndmeaAga!r

r1  DGGSFARMG AVACWNSVMD EDRYMVRRWN EFIAA 433
Ec  EYYQKLKAG R..... 387
Consenso #egsqearaG a.....

```

Figura 17. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína RL3370 de *Rhizobium leguminosarum* con los aminoácidos de la proteína PotD de *Escherichia coli*. En rojo se indican los aminoácidos conservados relevantes y su posición.

5.3. Análisis del crecimiento del mutante mutRL3370 de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* en diferentes medios de cultivo.

Se comparó el crecimiento del mutante mutRL3370 con la cepa parental UPM791 en varias condiciones.

Las cepas no mostraron diferencias significativas en su crecimiento cuando se crecieron en Rmin como se presenta en la figura 18.

Se ha indicado que el gen *RL3370* podría estar implicado en el transporte de poliaminas como la espermidina y putrescina. Se estudió la capacidad de crecimiento de ambas cepas cuando su única fuente de nitrógeno provenía de poliaminas como la espermidina o la putrescina. Para ello se preparó Rmin en el que se sustituyó el glutamato por espermidina o por putrescina (ver apartado 5.2 de Materiales y Métodos).

Los resultados mostraron que no hubo crecimiento alguno ni de la cepa UPM791 ni de la cepa mutRL3370 tras 8 días (datos no presentados).

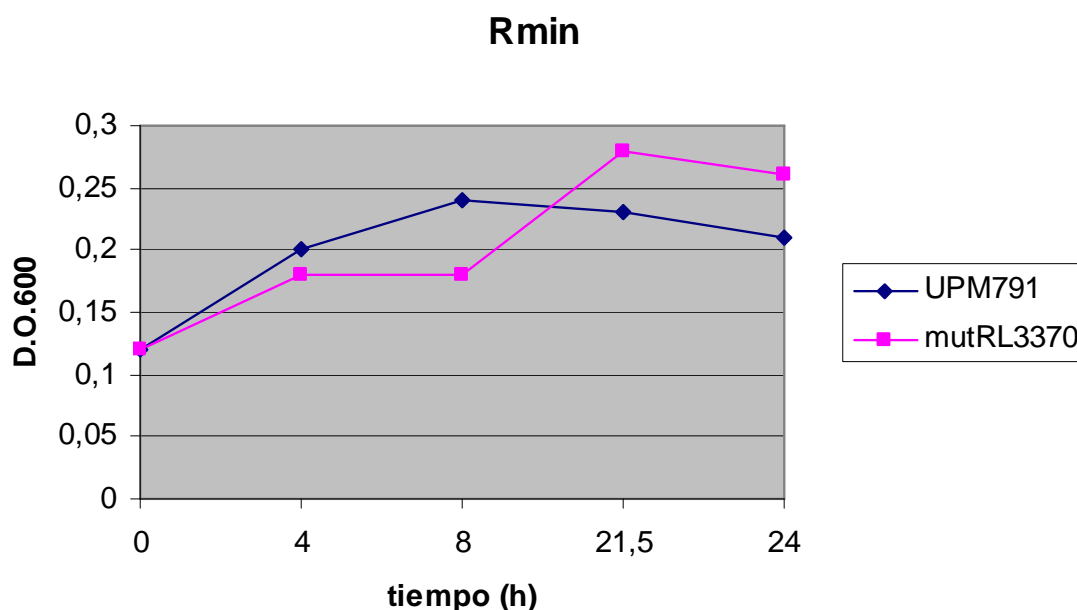


Figura 18: Crecimiento de las cepas de *R. leguminosarum* mut RL3370 y UPM791 en medio Rmin. Se crecieron en agitación a 28 °C. En ordenadas se indica la D.O. media a 600 nm, en abcisas el tiempo en horas.

5.4. Simbiosis de mutRL3370 con guisante (*Pisum sativum* L cv Frisson).

Para conocer si el mutantes mutRL3370 era capaz de formar nódulos y fijar nitrógeno en *Pisum sativum*, realizamos una inoculación de plántulas de guisante con las cepa de *Rhizobium leguminosarum* mutRL3370. Además se sembraron semillas inoculadas con la cepa silvestre UPM791 y un control sin inocular para establecer comparaciones.

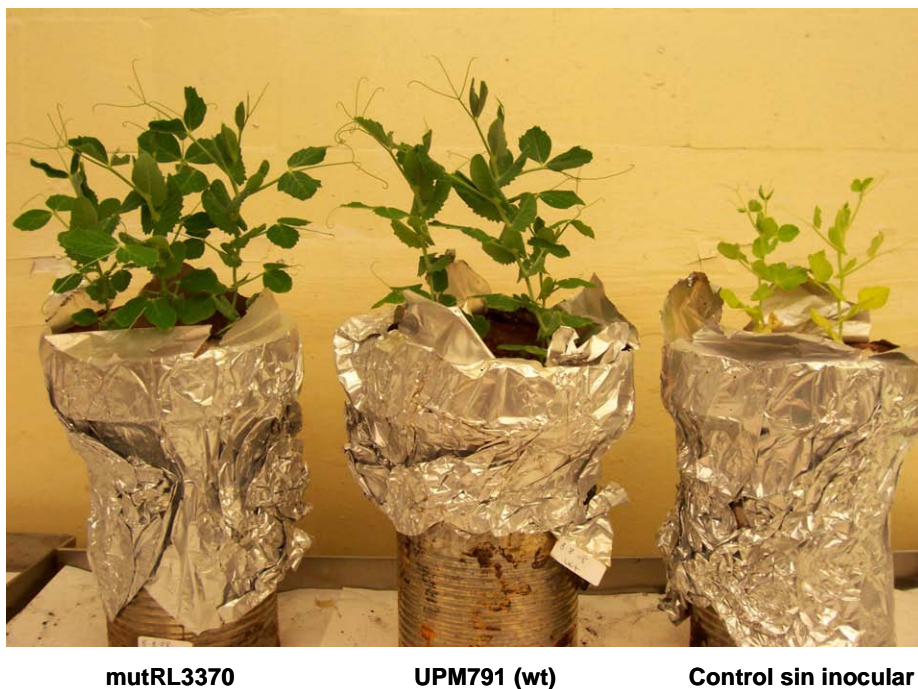


Figura 19: Fenotipo simbiótico de plantas de guisante inoculadas por distintas cepas de *R. leguminosarum*. Plantas de guisantes 21 días después de haber sido inoculadas con las cepas indicadas.

Pasadas tres semanas, las plantas inoculadas con la cepa mutRL3370 presentaban un aspecto sano, con hojas verdes y un porte similar a las plantas inoculadas con la cepa silvestre UPM791. El control sin inocular tenía una talla más pequeña, un color amarillento y ausencia de nódulos, lo que indica que creció en esterilidad como era de

esperar. Tanto la cepa mutRL3370 como la cepa UPM791 indujeron la formación de nódulos de aspecto similar en el sistema radicular.



Figura 20: Sistema radicular de guisantes infectados por las cepas UPM791 y mutRL3370 de *R. leguminosarum* *bv* *viciae*. 21 días después de ser inoculadas se muestra el aspecto del sistema radicular con nódulos.

VI DISCUSIÓN.

1. LA MUTATECA DE *Rhizobium leguminosarum* COMO HERRAMIENTA DE TRABAJO.

El genoma *Rhizobium leguminosarum* 3841 cuenta al menos con 102 genes que codifican proteínas dependientes del sistema de translocación de proteínas Tat (Jiménez, A., 2006). Análisis comparativos de la cepa 3841 con la secuencia preliminar de la cepa de trabajo de nuestro laboratorio, *Rhizobium leguminosarum* UPM791, mostraron que el 90% de los genes codificantes para proteínas Tat-dependientes están conservadas en ambas cepas (datos no presentados). De las 102 proteínas Tat-dependientes, el 37% son proteínas periplásmicas de unión a sustrato. Para conocer la función de estas proteínas, la disponibilidad de mutantes sería de gran utilidad.

Disponer de una mutateca con 13.824 mutantes organizados en 24 pisos de 576 colonias cada uno, significaría tener aproximadamente una probabilidad de 0,85 de identificar un mutante en cualquier gen si consideramos la simplificación de que todos los genes tienen la misma probabilidad de ser mutados. En este trabajo se ha construido una mutateca con 2.304 mutantes, organizados en 4 pisos completos que ofrece una probabilidad de 0,27 de obtener un mutante en un gen determinado.

Con la realización de este trabajo se ha desarrollado una metodología de construcción y manejo de la mutateca, que reducirá sustancialmente en un futuro el trabajo y el tiempo necesario para continuar y finalizar una mutateca con mayor número de aislados. El método de preparación de placas de microtiter con medio para sembrar los transconjugantes, permite un crecimiento de manera uniforme y libre de contaminaciones. La extracción de ADN a partir de colonias crecidas en placa asegura la presencia de ADN de todos los mutantes. También se ha podido validar el método mediante la localización de mutantes control incluidos entre los transconjugantes. Este hecho, no descarta que las condiciones probadas puedan no ser óptimas para la amplificación por PCR de genes mutados (tan sólo se utilizó un programa de PCR). En estas condiciones, se decidió buscar la presencia de mutaciones en cinco genes que codifican para proteínas dependientes del sistema Tat identificados en otro proyecto realizado en este laboratorio (Jiménez, A., 2006). Para ello, se realizaron una serie de reacciones de PCR que requerían el diseño de oligonucleótidos flanqueantes a los genes

de interés y los oligonucleótidos del minitransposón utilizado para obtener los transconjugantes (ver Fig 11).

Para la búsqueda de mutantes, en primer lugar se realizaron dos reacciones de PCR con ADN de pisos completos, cada PCR con cada uno de los dos oligonucleótidos diseñados para cada gen. Cabría esperar que la presencia de una mutación en el lote de ADN analizado se reflejara en una banda de amplificación para cada una de las reacciones de PCR. Sin embargo, generalmente, sólo se obtuvo un resultado positivo con uno de los oligos. Esto refleja que cada combinación de oligos requiere condiciones de amplificación diferentes.

En el siguiente paso, se realizaron PCR de lotes de ADN de filas por columnas procedentes del piso donde se hubiera obtenido un resultado positivo. A priori debía obtenerse una banda positiva del mismo tamaño para cada mutante en su fila y su columna correspondiente. Los resultados obtenidos mostraron en varias ocasiones bandas de diferentes tamaños. Esto podría explicarse por la presencia de más de un mutante para un gen determinado o por la presencia de falsos positivos. Con objeto de eliminar estos falsos positivos se puede modificar la temperatura en la PCR para hacerla más restrictiva. En último término se analizaron varios candidatos por reacciones de PCR con el ADN aislado de cada uno de ellos.

Con lo descrito anteriormente, finalmente se identificó un mutante en el gen *RL3370*. Por tanto, mediante reacciones de PCR se puede analizar esta mutateca de manera relativamente sencilla y eficaz.

2. LOCALIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE UN MUTANTE EN EL GEN *RL3370* DE *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*.

En estudios previos a este trabajo se han identificado 5 proteínas homólogas a proteínas relacionadas con el transporte de sustratos dependientes de Tat: *pRL100348*, *pRL100337*, *RL3370*, *pRL9020*, y *R4142* (Jiménez A., 2006).

Analizando la mutateca disponible se identificó un mutante en el gen que codifica para la proteína *RL3370* y se denominó *mutRL3370*. En esta ocasión, en las reacciones de PCR, tan sólo se obtuvo banda de amplificación al emplear los lotes de ADN con el

oligonucleótido U3370-W5 lo que permitió reducir la búsqueda del mutante a dos candidatos. Una vez aislado el ADN de los candidatos, se realizaron PCR con los 4 oligos específicos disponibles del gen *RL3370*, y en esta ocasión, tan sólo se obtuvo banda de amplificación con el oligonucleótido U3370.

El mutante se secuenció utilizando el oligonucleótido aadA1846 perteneciente a uno de los extremos del transposón insertado en el gen. Al analizar la secuencia se localizó la inserción del transposón y se comprobó que los tamaños de las bandas de amplificación obtenidas en los geles de agarosa con los oligonucleótidos U3370 y U3370-W5, coincidían con el tamaño de banda que cabía esperar para cada amplificación. Además la localización de la inserción explica porqué no se obtuvieron bandas con los oligonucleótidos L3370-W3 y L3370. Con el oligonucleótido L3370-W3 no se podía amplificar el ADN ya que la inserción del transposón se encontraba fuera de la región de ADN comprendida entre los oligos utilizados en la reacción (teniendo en cuenta el sentido de amplificación del oligonucleótido) (ver Fig 11 de Resultados). En el caso del oligo L3370 el hecho de no haber obtenido banda de amplificación podría deberse a que el tamaño de banda esperado es de 2.2 kb y las condiciones experimentales no favorecerían su amplificación.

3. CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA CEPA mutRL3370.

En este trabajo se ha analizado la mutación en el gen *RL3370* de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* UPM791. Los resultados muestran que este gen no es esencial para la vida libre de la bacteria, al menos en las condiciones probadas.

Al analizar la secuencia aminoacídica, se encontró una homología significativa de la proteína RL3370 con la proteína PotD de *Escherichia coli*. Al igual que PotD, se comprobó que el gen que codifica la proteína RL3370 forma parte de un operón con los genes que codifican un sistema transportador de tipo ABC. La proteína PotD se ha descrito como una proteína periplásmica de unión a polaminas, principalmente a espermidina (Igarashi & Kashiwagi, 2000).

Para la proteína PotD se han descrito aminoácidos importantes para su función de unión al sustrato. Algunos de estos aminoácidos también están conservados en la proteína de unión a poliaminas PotF (Igarashi & Kashiwagi, 2000) y en la proteína RL3370 como se presenta en este trabajo. Los dos aminoácidos conservados entre PotD y RL3370 son concretamente Trp²⁸⁸ y Tyr²⁹³ (ver figura 17). Este hecho indica que estos aminoácidos en RL3370 también podrían ser claves en la función de unión al sustrato.

Para estudiar la función de la proteína RL3370 se analizó el crecimiento se estudió el comportamiento de la cepa mutRL3370 en diferentes medios de cultivo. En primer lugar se comparó el crecimiento entre la cepa mutRL3370 y la cepa UPM791 en medio Rmin sin observarse diferencias significativas en el crecimiento. Por otra parte se estudió la capacidad de la bacteria para obtener el nitrógeno necesario para vivir a partir de poliaminas, en cuyo transporte podría estar involucrada la proteína RL3370. Se preparó medio Rmin en el que se sustituyó el glutamato por espermidina ó putrescina como única fuente de nitrógeno. Tras inocular y crecer durante 10 días las cepas UPM791 y mutRL3370 en estos medios, no se obtuvo crecimiento alguno de ninguna de las cepas. Este hecho podría deberse a la incapacidad por parte del rizobio de obtener nitrógeno para crecer únicamente a partir de poliaminas como la espermidina o la putrescina. Sería interesante encontrar condiciones de cultivo en las que las poliaminas fueran necesarias para el crecimiento de la bacteria. En estas condiciones se estudiaría si la cepa mutada tendría mayores dificultades en su crecimiento que la cepa silvestre. Por otro lado, al inocular plantas de *Pisum sativum* con el mutante mutRL3370y estudiar el crecimiento de las plantas, su talla, y los nódulos en la raíz, no se observaron diferencias entre las plantas inoculadas con el mutante y las plantas inoculadas con la cepa silvestre. La mutación en el gen *RL3370* no afecta al fenotipo simbiótico.

Las poliaminas son esenciales para el crecimiento y multiplicación normales tanto de las células procarióticas como eucarióticas (Cohen, 1997). En bacterias, la síntesis, degradación e importación de poliaminas está coordinada. Recientemente, se ha demostrado una relación de las poliaminas con la multiplicación y colonización exitosa de bacterias en diferentes huéspedes (Shah y Swiatlo, 2008).

En general, las plantas producen mayor número de poliaminas ante situaciones de estrés (Aleti et al, 2008). Un aspecto importante en la diversidad metabólica de *Rhizobium* es su adaptación a la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Sobre este aspecto es importante la habilidad de catabolizar compuestos específicos aportados por la planta y adaptarse a

las condiciones específicas en el nódulo. Se ha postulado que los niveles de poliaminas en plantas hospedadoras influye en la interacción *Agrobacterium*-plántulas de berenjena (Kumar y Rajam, 2005). Por ello, podría ser interesante estudiar la efectividad de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa en relación a diferentes niveles de poliaminas y estudiar la expresión del gen *RL3370* en esas condiciones.

El hecho de que no se encuentren diferencias significativas entre la cepa silvestre y *mutRL3370* podría estar relacionado con que *Rhizobium leguminosarum* 3841 presenta otras potenciales proteínas periplásmicas de unión a poliaminas, una Tat –dependiente (pRL120142) y otra (pRL120137) no dependiente del sistema Tat (Rhizobase). Una mutación múltiple que afectara a estas proteínas permitiría apreciar mejor el papel del transporte de poliaminas en diferentes condiciones.

VII CONCLUSIONES.

- 1) Se ha desarrollado una metodología de obtención, ordenación y conservación de mutantes obtenidos por transposición aleatoria de *Rhizobium leguminosarum bv viciae* generándose una mutateca con 2.304 mutantes.
- 2) Se ha determinado un método de extracción de ADN total de lotes 576 colonias de mutantes que permite amplificar un mutante control.
- 3) Se ha podido localizar un mutante en *R. leguminosarum* (mutRL3370) en el gen *RL3370*, a partir de la mutateca.
- 4) La proteína RL3370 es homóloga a proteínas periplásmicas de unión a substratos como poliaminas y Fe pertenecientes a transportadores de tipo ABC.
- 5) La proteína RL3370 no es esencial para la simbiosis *Rhizobium-Pisum sativum*.

VIII BIBLIOGRAFÍA.

- Aleti, A., Chaves, A., Fracaroli, V., Sanchez, D., Ruiz, O. A., and Maiale, S.** (2008) Transformación vegetal con genes de la biosíntesis de poliaminas regulados por un promotor inducible por estrés. Su potencial aplicación biotecnológica a variedades nacionales de arroz. *Colomb. Biotecnol.* Vol 10 n° 1. 143-148.
- Beringer, J.E.** (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **84**: 188-198.
- Berks, B.C.** (1996) A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol.* **22**: 393-404.
- Berks, B.C., Sargent, F., and Palmer, T.** (2000) The Tat protein export pathway. *Mol. Microbiol.* **35**: 260-274.
- Birnboim, H.C., and Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Cameron, D.E., Urbach, J.M., and Mekalanos, J.J.** (2008) A defined transposon mutant library and its use in identifying motility genes in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105(25)**: 8736-8741.
- Cline, K., and Mori, H.** (2001) Thylakoid DeltapH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J Cell Biol* **154**: 719-729.
- Cohen, S.S.** (1997) A guide to the polyamines. *Oxford University Press*, New York, USA.
- Davidson, A.L., and Maloney, P.C.,** (2007) ABC transporters: how small machines do a big job. *Trends Microbiol.* Vol 15 n° 10. 448-455.
- Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C., and Chen, J.** (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* Vol 72 n° 2 317-364.
- Davila, F.** (2005) Identificación de proteínas dependientes del sistema TAT necesarias para el crecimiento de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* en medios ricos. Proyecto Fin de Carrera, Departamento de Biotecnología Universidad Politécnica de Madrid.
- Di Gregorio, S., Zocca, C., Sidler, S., Toffanin, A., Lizzari, D., and Vallini, G.** (2004) Identification of two new sets of genes for dibenzothiophene transformation in *Burkholderia* sp. DBT1. *Biodegradation* **15**: 111-123.
- Dreyfus, B.L., Elmerich, C. & Dommergues, Y. R.** (1983) Free-living *Rhizobium* strain able to grow on N₂ as the sole nitrogen source. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 711-713.

- French, C.T., Lao, P., Loraine, A.E., Matthews, B.T., Yu, H., and Dybvig, K.** (2008) Large-scale transposon mutagenesis of *Mycoplasma pulmonis*. *Mol. Microbiol.* **69**(1): 67-76.
- Galston, A.W. and Sawhney, R.K.** (1990) Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol.* **94**: 406-410.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hiroaki, I., Nojima, H. and Okayama, H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Igarashi, K., Kashiwagi, K.** (2000) Polyamines: Misterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**: 559-564.
- Igarashi, K., Kashiwagi, K.** (1999) Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochem. J.* **344**: 633-642.
- Ish-Horowicz, D., and Burke, J.F.** (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* **9**: 2989-2998.
- Jiménez, A.** (2006) Caracterización de proteínas dependientes del sistema Tat en *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*. Proyecto Fin de Carrera, Departamento de Biotecnología Universidad Politécnica de Madrid.
- Jordan, D.C.** (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov. a genus of show-growing root-nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacterial* **32**, 136-139.
- Kumar, S., Rajam, M.V.** (2005) Polyamines enhance *Agrobacterium tumefaciens* vir gene induction and T-DNA transfer. *Plant science.* **168**. 475-460.
- Leyva, A., Palacios, J.M., Mozo, T., and Ruiz-Argueso, T.** (1987) Cloning and characterization of hydrogen uptake genes from *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol* **169**: 4929-4934.
- Meloni, S., Rey, L., Sidler, S., Imperial, J., Ruiz-Argueso, T., and Palacios, J.M.** (2003) The twin-arginine translocation (Tat) system is essential for *Rhizobium*-legume symbiosis. *Mol Microbiol* **48**: 1195-1207.
- Mendoza, C., and Rocha, P.J.** (2002) Poliaminas: reguladores del crecimiento con múltiples efectos en las plantas. PALMAS. Vol 23 n° 4.
- Oliver, D.B.** (1996) Periplasm. In *Neidhart F. C (ed.), Escherichia coli and Salmonella.* p. p. 88-103.
- O'Gara, F.S., K. T.** (1976) Regulation of nitrogen fixation by rhizobia: export of fixed nitrogen as NH_4^+ . *Biochim. Biophys. Acta* **437**: 313-321.

- Pallen, M.J., Chaudhuri, R.R., and Henderson, I.R.** (2003) Genomic analysis of secretion systems. *Curr Opin Microbiol* **6**: 519-527.
- Río C. del.** (2007) Caracterización del transportador SteT: primer modelo procariota de la familia Lat. Tesis Doctoral. Facultad de Biología de Barcelona.
- Robinson, C., Cai, D., Hulford, A., Brock, I.W., Michl, D., Hazell, L., Schmidt, I., Herrmann, R.G., and Klosgen, R.B.** (1994) The presequence of a chimeric construct dictates which of two mechanisms are utilized for translocation across the thylakoid membrane: evidence for the existence of two distinct translocation systems. *Embo J* **13**: 279-285.
- Robinson, C., and Bolhuis, A.** (2004) Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 135-147.
- Ruiz-Argueso, T., Hanus, F. J. and Evans, H. J.** (1978) Hydrogen production and uptake by pea nodules affected by strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Arc.h Microbiol.* **116**: 113-118.
- Sambrook, J., and Russell, D.** (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Santini, C.L., Ize, B., Chanal, A., Muller, M., Giordano, G., and Wu, L.F.** (1998) A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *Embo. J.* **17**: 101-112.
- Cline, K., and Mori, H.** (2001) Thylakoid DeltapH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J Cell Biol* **154**: 719-729.
- Simon, R., Prierer, U. and Puhler, A.** (1983) Abroad host range mobilization system for "in vivo" genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram - negative bacteria. *Bio/Technology* **1**: 784-791.
- Shah, P., and Swiatlo, E.** (2008) A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Molec.Microbiology* **68**(1): 4-16.
- Slocum, R.D. and Flores, H.E.** (1991) Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Tabor, C.W., Tabor, H.** (1985) Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.* **49**: 81-99.
- Tiburcio, A.F., Altabella, T. and Borrell, A.; Masgrau, C.** (1997) Polyamine metabolism and its regulation. *Physiol.Plant* **100**: 664-674.
- Wang, T., y Martinez –Romero, E.** (2000). Phylogeny of root-and stem-nodule bacteria associated with legumes. En Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process. *Triplett, E.W. (ed). Wymondham, UK: Horizon Scientific Press*, pp.177-186.
- Wexler, M., Bogsch, E.G., Klosgen, R.B., Palmer, T., Robinson, C., and Berks, B.C.** (1998) Targeting signals for a bacterial Sec-independent export system direct

plant thylakoid import by the delta pH pathway. *FEBS. Lett.* **431**: 339-342.

Young, J.P., et al. (2006) The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome biology.* **7(4)**:R34.