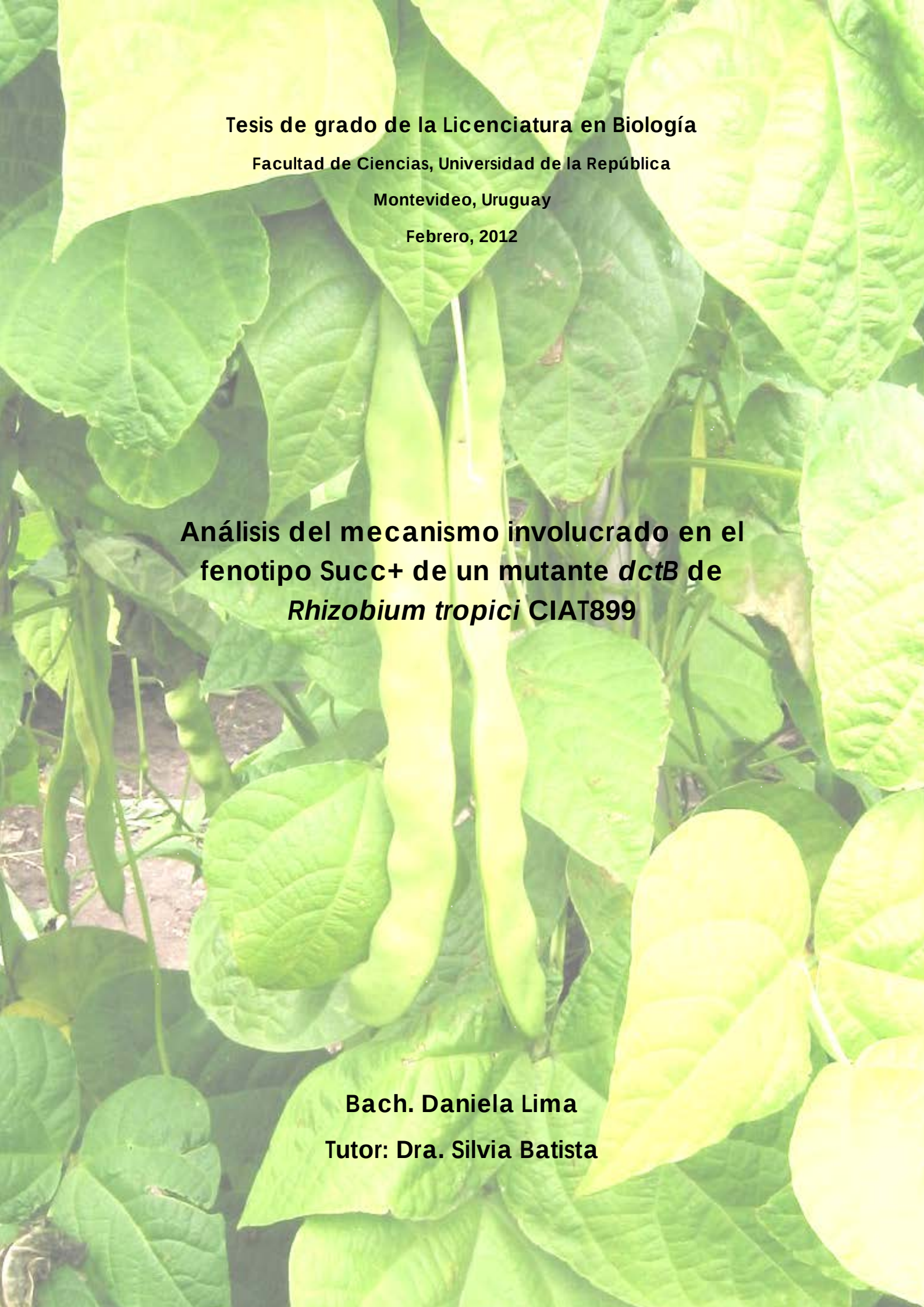




**Tesis de grado de la Licenciatura en Biología**

**Facultad de Ciencias, Universidad de la República**

**Montevideo, Uruguay**

**Febrero, 2012**

**Análisis del mecanismo involucrado en el  
fenotipo Succ<sup>+</sup> de un mutante *dctB* de  
*Rhizobium tropici* CIAT899**

**Bach. Daniela Lima**

**Tutor: Dra. Silvia Batista**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al terminar esta etapa de mi vida quisiera agradecer de todo corazón a:

- Dios: Por darme la fuerza, la paciencia y la voluntad para seguir adelante y superar los obstáculos y momentos difíciles que se fueron presentando en el camino.
- A mis padres y hermanos: Por todos los sacrificios, penas y alegrías que compartieron conmigo, hoy dieron su recompensa.
- Al compañero de mi vida, Henry: por el permanente e incondicional apoyo y comprensión que me ha brindado en todos los aspectos de mi vida sobretodo en mi carrera.
- A mi orientadora Dra. Silvia Batista por sus enseñanzas, valiosas sugerencias y su constante disposición.
- A mis compañeros de facultad y laboratorio con los cuales he compartido largas horas de estudio y trabajo. Gracias por sus sugerencias, apoyo y compañerismo.

Y muchas gracias a todos los amigos y a aquellas personas que de alguna forma u otra han aportado para que este trabajo saliera adelante.

## INDICE DE CONTENIDOS

### RESUMEN

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUCCIÓN .....                                                                       | 9  |
| 1.1. FBN en la simbiosis rizobio-leguminosa .....                                           | 9  |
| 1.2. Generalidades de rizobio .....                                                         | 10 |
| 1.3. Clasificación taxonómica de rizobio .....                                              | 11 |
| 1.3.1. <i>Rhizobium tropici</i> .....                                                       | 12 |
| 1.4. Intercambio de señales entre el rizobio y la leguminosa .....                          | 13 |
| 1.5. Respuesta de la leguminosa a los factores Nod.....                                     | 16 |
| 1.5.1. Nódulos determinados e indeterminados .....                                          | 17 |
| 1.6. Metabolismo del carbono en rizobios .....                                              | 18 |
| 1.7. Metabolismo del carbono en bacteroides.....                                            | 19 |
| 1.7.1. Provisión de carbono al bacteroide.....                                              | 20 |
| 1.7.2. Ciclo de los ATCs en bacteroides.....                                                | 22 |
| 1.7.2.1. Síntesis de Acetil-CoA.....                                                        | 24 |
| 1.7.3. El ciclo de los ATCs puede funcionar de forma incompleta en algunos bacteroides..... | 25 |
| 1.8. Sistema de transporte de ADCs en rizobio.....                                          | 27 |
| 1.8.1. Transportador de ADCs .....                                                          | 29 |
| 1.8.2. Sistema regulador de dos componentes .....                                           | 30 |
| 1.9. Sistema de transporte alternativo de succinato.....                                    | 31 |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....                                                               | 34 |
| 2.1. Hipótesis de trabajo .....                                                             | 34 |
| 2.2. Objetivos .....                                                                        | 34 |
| 2.2.1. Objetivo general .....                                                               | 34 |
| 2.2.2. Objetivos específicos .....                                                          | 34 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....                                                                | 35 |
| 3.1. Microorganismos y plásmidos utilizados.....                                            | 35 |
| 3.2. Medios y condiciones de cultivo bacteriano .....                                       | 37 |
| 3.3. Antibióticos e indicadores.....                                                        | 38 |
| 3.4. Ensayos de actividad enzimática .....                                                  | 38 |
| 3.5. Técnicas moleculares .....                                                             | 39 |

|        |                                                                                                                                                           |    |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5.1. | Purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina y fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa 1% .....                                                 | 39 |
| 3.5.2. | Digestión de ADN con enzimas de restricción .....                                                                                                         | 39 |
| 3.5.3. | Análisis de la secuencia parcial del gen <i>dctB</i> .....                                                                                                | 39 |
| 3.5.4. | Amplificación del gen <i>dctB</i> .....                                                                                                                   | 40 |
| 3.5.5. | Ligación de productos de PCR.....                                                                                                                         | 41 |
| 3.6.   | Técnicas genéticas .....                                                                                                                                  | 43 |
| 3.6.1. | Transformación bacteriana por choque térmico de <i>E. coli</i> .....                                                                                      | 43 |
| 3.6.2. | Transformación bacteriana por choque eléctrico de <i>R. tropici</i> .....                                                                                 | 43 |
| 3.7.   | Técnicas bioquímicas.....                                                                                                                                 | 43 |
| 3.7.1. | Ensayos de plantas .....                                                                                                                                  | 43 |
| 4.     | RESULTADOS .....                                                                                                                                          | 45 |
| 4.1.   | Ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa del <i>pdctA</i> en las cepas CIAT899 y GA1 ( <i>dctA</i> ) de <i>R. tropici</i> .....                         | 45 |
| 4.2.   | Construcción de mutantes en el gen <i>dctB</i> .....                                                                                                      | 47 |
| 4.2.1. | Procedimiento.....                                                                                                                                        | 47 |
| 4.3.   | Perfil de crecimiento de las cepas salvajes y mutantes.....                                                                                               | 53 |
| 4.4.   | Ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa del <i>pdctA</i> en las cepas GA2 ( <i>dctB</i> ) y GA21 ( <i>dctAdctB</i> ) de <i>R. tropici</i> .....        | 57 |
| 4.5.   | Ensayo de nodulación de <i>P. vulgaris</i> .....                                                                                                          | 59 |
| 5.     | DISCUSIÓN.....                                                                                                                                            | 60 |
| 5.1.   | Ensayo de perfil de crecimiento y actividad $\beta$ -galactosidasa del <i>pdctA</i> en las cepas CIAT899 y GA1 ( <i>dctA</i> ) de <i>R. tropici</i> ..... | 60 |
| 5.2.   | Comportamiento de los mutantes <i>dctB</i> en condiciones de vida libre y en simbiosis con <i>P. vulgaris</i> . .....                                     | 63 |
| 5.2.1. | Perfil de crecimiento en MM de las cepas mutantes .....                                                                                                   | 63 |
| 5.2.2. | Ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa del <i>pdctA</i> en las cepas GA2 ( <i>dctB</i> ) y GA21 ( <i>dctAdctB</i> ) de <i>R. tropici</i> .....        | 65 |
| 5.3.   | Ensayos en plantas .....                                                                                                                                  | 66 |
| 6.     | CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....                                                                                                                          | 68 |

## BIBLIOGRAFÍA

## APÉNDICE

## INDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Estructura general de los factores Nod producidos por rizobios.....                                                                                                                     | 15 |
| Figura 2. Modelo de la participación funcional de los receptores NFR1 y NFR5 en la percepción de las señales provenientes de rizobios y micorrizas.....                                           | 15 |
| Figura 3. Esquema correspondiente a nódulos determinados e indeterminados desarrollados en leguminosas.....                                                                                       | 18 |
| Figura 4. Esquema representativo del metabolismo del carbono dentro del nódulo y el intercambio de nutrientes entre un bacteroide fijador de nitrógeno y la célula vegetal.....                   | 21 |
| Figura 5. Ciclo de los ATCs.....                                                                                                                                                                  | 24 |
| Figura 6. Organización de los genes <i>dct</i> en <i>S. meliloti</i> .....                                                                                                                        | 28 |
| Figura 7. Sistema de transporte de ADCs en rizobio.....                                                                                                                                           | 29 |
| Figura 8. Organización del locus <i>kgt</i> en <i>R. tropici</i> CIAT899.....                                                                                                                     | 33 |
| Figura 9. Secuencia nucleotídica parcial del gen <i>dctB</i> ligada al vector pSK-B.....                                                                                                          | 42 |
| Figura 10. Actividad de enzima testigo $\beta$ -galactosidasa en <i>R. tropici</i> CIAT899 y <i>R. tropici</i> GA1 con el plásmido pRU103.....                                                    | 46 |
| Figura 11. Electroforesis del fragmento interno del gen <i>dctB</i> obtenido por una reacción de PCR generada a partir del vector pSK-B utilizando los cebadores BDSK1 y BDSK2.....               | 50 |
| Figura 12: Vector pCR2.1-TOPO.....                                                                                                                                                                | 51 |
| Figura 13: Esquema de los posibles cointegrados.....                                                                                                                                              | 52 |
| Figura 14: Electroforesis de productos de PCR.....                                                                                                                                                | 53 |
| Figura 15: Perfil de crecimiento de <i>R. tropici</i> CIAT899 y su mutante <i>dctB</i> (GA2) cultivadas en MM con $\text{CaCl}_2$ 1 mM y $\text{NH}_4\text{Cl}$ 20 mM como fuente de nitrógeno... | 55 |
| Figura 16: Perfil de crecimiento de GA1 y su mutante <i>dctB</i> (GA21) cultivadas en MM con $\text{CaCl}_2$ 1 mM y $\text{NH}_4\text{Cl}$ 20 mM como fuente de nitrógeno.....                    | 56 |
| Figura 17: Actividad de enzima testigo $\beta$ -galactosidasa en las cepas GA2 ( <i>dctB</i> ) y GA21 ( <i>dctAdctB</i> ) de <i>R. tropici</i> con el plásmido pRU103 ( <i>pdctA::lacZ</i> )..... | 58 |

## ABREVIATURAS

|       |                                                                        |
|-------|------------------------------------------------------------------------|
| ADCs  | ácidos C <sub>4</sub> -dicarboxílicos                                  |
| AI    | Invertasa alcalina                                                     |
| Amp   | ampicilina                                                             |
| ATCs  | ciclo de los ácidos tricarboxílicos                                    |
| CS    | citrato sintasa                                                        |
| D.O.  | densidad óptica                                                        |
| FBN   | fijación biológica de nitrógeno                                        |
| Gm    | gentamicina                                                            |
| IT    | hilo de infección                                                      |
| Km    | kanamicina                                                             |
| MDH   | malato deshidrogenasa                                                  |
| MPB   | membrana peribacteroidal                                               |
| Nal   | ácido nalidíxico                                                       |
| NCBI  | <i>National Centre for Biotechnology Information</i>                   |
| OAA   | oxalacetato                                                            |
| ORF   | <i>open reading frame</i> (marco abierto de lectura)                   |
| PCR   | <i>polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa) |
| PDH   | piruvato deshidrogenasa                                                |
| PEP   | fosfoenolpiruvato                                                      |
| PEPC  | fosfoenolpiruvato carboxilasa                                          |
| SS    | sacarosa sintasa                                                       |
| SDS   | dodecil sulfato de sodio                                               |
| SDH   | complejo succinato deshidrogenasa                                      |
| X-Gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactopiranósido                  |

## RESUMEN

Durante la simbiosis rizobio-leguminosa, la bacteria diferenciada como bacteroide consume los nutrientes proporcionados por el hospedero y reduce el  $N_2$  atmosférico a amonio, el cual es exportado a la planta. Los ácidos  $C_4$ -dicarboxílicos (ADCs) (malato, succinato y fumarato) son esenciales para el bacteroide como fuente de carbono y poder reductor. Estos ácidos ingresan a un ciclo de Krebs modificado, expresando vías *by-pass* en pasos sensibles al ambiente microaerofílico del nódulo, como la 2-oxoglutarato deshidrogenasa. El sistema de transporte de  $C_4$ -dicarboxilatos está formado por los genes *dctA*, que codifica para una permeasa DctA y *dctBD* que codifican para un sistema sensor-regulador de dos componentes, y que activan la transcripción de *dctA* en respuesta a la presencia  $C_4$ -dicarboxilatos. Los mutantes *dctA* no crecen en ADCs.

*Rhizobium tropici* es capaz de nodular varias leguminosas incluyendo *Phaseolus vulgaris*. Originalmente, un mutante *dctA* (GA1) derivado de la cepa de *R. tropici* CIAT899, creció en presencia de succinato pero no malato o fumarato como únicas fuentes carbonadas. Esto permitió identificar otros tres genes organizados de forma similar a los genes *dct*, responsables del crecimiento de GA1 (*dctA*) en succinato. Estos genes codifican para un sistema de transporte (Kgt) de 2-oxoglutarato y, con baja afinidad, puede también transportar succinato. La expresión de *kgtP*, que codifica para la permeasa, es controlada por otro sistema de dos componentes denominado KgtRS. El gen *kgtP* se induce por 2-oxoglutarato en CIAT899 y por succinato y 2-oxoglutarato en el mutante GA1.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos a partir de dos nuevos mutantes *dctB* derivados de las cepas CIAT899 y GA1, denominados GA2 (*dctB*) y GA21 (*dctAdctB*) respectivamente. Estos dos mutantes exhibieron un fenotipo similar a GA1 en lo que refiere a su crecimiento en ADCs y fenotipo simbiótico  $Fix^-$ . Ambas cepas fueron capaces de crecer en presencia de succinato y 2-oxoglutarato. El promotor del gen *dctA* fue inducido en la cepa GA21 (*dctAB*) en presencia de todas las fuentes de carbono ensayadas. En cambio, en la cepa GA2 (*dctB*) el promotor no fue inducido bajo las mismas condiciones de crecimiento. Se discute si esta expresión diferencial se

explica como consecuencia del *cross-talk* de los dos sistemas DctBD y KgtRS en un contexto genómico mutante en las cepas GA2 y GA21.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. FBN en la simbiosis rizobio-leguminosa

El nitrógeno es un elemento fundamental para el desarrollo de los seres vivos ya que forma parte de moléculas esenciales, entre ellas los ácidos nucleicos, vitaminas y aminoácidos. A pesar de que la atmósfera tiene un alto contenido de nitrógeno diatómico (78%), sólo pocos microorganismos procariotas son capaces de reducirlo y usarlo en sus procesos vitales. Estos microorganismos se denominan diazótrofos y el proceso fisiológico involucrado, fijación biológica de nitrógeno (FBN). Los diazótrofos están ampliamente distribuidos en grupos parafiléticos con diferentes estilos de vida y metabolismos, incluyendo formas de vida libre y en simbiosis con eucariotas (Young, 1992; Raymond y col., 2004).

La FBN es llevada adelante por algunas arqueas y por organismos pertenecientes a seis de los más de cincuenta *filum* bacterianos descritos hasta el momento. De los seis *filum* de diazótrofos bacterianos, la división bacteriana más abundante es el subgrupo  $\alpha$ -*Proteobacteria*, y en el que se incluyen la mayoría de los rizobios (Willems, 2006).

La FBN en asociación simbiótica con rizobios está limitada exclusivamente a la familia de plantas *Leguminosae*, aunque excepcionalmente se ha descrito una simbiosis con una planta no leguminosa, *Parasponia*, de la familia *Ulmaceae* (Trinick, 1979). Las leguminosas constituyen un grupo diverso e importante dentro del grupo de las angiospermas. Con más de 730 géneros y 19.400 especies, las leguminosas son la tercer familia más grande dentro de las plantas superiores, y son las segundas en importancia ecológica y económica luego de la familia *Gramineae* (Wojcienchowski y col., 2004). La FBN en asociación simbiótica genera una ventaja adicional, ya que mediante este proceso algunas plantas leguminosas de importancia económica son capaces de acceder a una fuente ilimitada de nitrógeno. Esta simbiosis es responsable de un 25% de la fijación biológica de nitrógeno mundial, y provee a las plantas leguminosas una importante fuente de nitrógeno que evita gastos en fertilizantes químicos (Batut y col., 2004; Masson-Boivin y col., 2009).

La capacidad de fijar nitrógeno atmosférico depende del complejo multienzimático conocido como Nitrogenasa. Este complejo es muy sensible al oxígeno y por esta razón requiere un entorno con baja tensión de ese elemento gaseoso (Zehr y

col., 1993).

La FBN es un proceso que requiere una gran inversión de energía, de 16 a 24 moléculas de ATP por cada 8 electrones transportados, más el costo de la producción de H<sub>2</sub> y de otros procesos de transporte asociados (Dixon y Kahn, 2004). La reducción del nitrógeno a amonio se describe en la siguiente reacción:



Dada la alta sensibilidad del complejo Nitrogenasa al oxígeno, los microorganismos diazótrofos han desarrollado diferentes estrategias para proteger a la enzima de su inactivación. Los nódulos mantienen una baja concentración de oxígeno libre en la parte central del nódulo mediante diferentes mecanismos, incluyendo la presencia de barreras físicas de difusión para el oxígeno en la periferia del nódulo o parénquima, la participación de una proteína de unión al oxígeno derivada de la planta (leghemoglobina) y la expresión de una elevada tasa metabólica del microsimbionte. Los nódulos poseen una capa de células no infectadas que rodean la región interna de células infectadas con bacteroides, restringiendo el flujo de oxígeno (Minchin y col., 1985; Sheehy y col., 1985). Además, la presencia de leghemoglobina en el citoplasma de las células infectadas mantiene el oxígeno libre a concentraciones del orden de nanomolar, evitando la inactivación de la Nitrogenasa mientras se mantiene un flujo de oxígeno suficiente para la respiración del bacteroide (Ott y col., 2005). Por otro lado, en el bacteroide, la presencia de un sistema de citocromos de alta afinidad asegura la producción de ATP a concentraciones de oxígeno muy bajas (menos de 10 nM) (Appleby y col., 1983).

## 1.2. Generalidades de rizobio

En este trabajo se considera bajo el término “rizobio” a las bacterias capaces de fijar nitrógeno atmosférico luego de asociarse simbióticamente con plantas leguminosas. Durante la asociación se forma un nuevo órgano en la raíz (o a veces en el tallo) denominado nódulo, donde las bacterias alojadas en pequeños organelos llamados simbiosomas, reducen el nitrógeno atmosférico a amonio. Como huésped del vegetal, la bacteria inicia un proceso de diferenciación a bacteroide, que presenta características

fisiológicas, genéticas y morfológicas particulares. La asociación depende de un intercambio de señales entre ambos organismos (Oke y Long, 1999; 2002). Durante la simbiosis, la planta suministra a la bacteria compuestos carbonados, los cuales serán metabolizados para satisfacer los requerimientos de la FBN y el metabolismo basal del bacteroide. El nitrógeno reducido a amonio es exportado como tal (y parcialmente como alanina) por el bacteroide hacia el espacio peribacteroide. Luego, el amonio fijado es transportado a través de la membrana del simbiosoma y asimilado por el vegetal. (Udvardi y Day, 1997).

En general, la simbiosis es especie-específica: los rizobios de una especie sólo son capaces de asociarse a una especie de leguminosa. Sin embargo, existen algunos rizobios “promiscuos” que son capaces de asociarse con varios tipos de leguminosas y viceversa (Perret y col., 2000).

### 1.3. Clasificación taxonómica de rizobio

A partir de un nódulo de raíz de leguminosa, en 1888 Beijerinck obtuvo por primera vez un cultivo bacteriano puro, denominándolo *Bacillus radicola*. Un año después, Frank propuso el nombre de rizobio para estos organismos, y todas las sucesivas especies identificadas fueron incluidas en el género *Rhizobium*. En 1929 ya se habían definido seis especies. Estas se denominaron según la planta hospedero de la cual habían sido aisladas como: *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium japonicum* y *Rhizobium lupini*. El criterio para esta clasificación se basó en la hipótesis de un rizobio-una planta. Esto derivó en el concepto de “grupos de inoculación cruzada”, en los cuales los rizobios se agrupaban de acuerdo a sus hospederos correspondientes (Fred y col., 1932).

En la década de 1960, los investigadores comenzaron a utilizar como herramientas de clasificación diversas características morfológicas, bioquímicas, nutricionales y serológicas. También se consideraron propiedades simples del ADN, como por ejemplo el contenido porcentual de GC (Graham, 1964; De Ley y Rassel, 1965).

Los avances tecnológicos de los últimos años han permitido mejorar los estudios taxonómicos de modo de reflejar, lo más posible, la evolución y las relaciones filogenéticas de los organismos. Es así que se ha extendido el uso de técnicas

moleculares como las hibridaciones ADN-ADN y ADN-ARNr, el análisis de secuencia del gen de la subunidad 16S del ARNr y el análisis comparativo de genomas. Esto, sumado a un aumento en el número de leguminosas estudiadas en los últimos años, determinó un incremento y reorganización en el número de géneros y especies de rizobios (Willems, 2006).

Hasta la fecha, se han descrito 92 especies de rizobios distribuidas en 12 géneros. Dentro de las  $\alpha$ -proteobacterias, la gran mayoría pertenece al orden *Rhizobiales*, que incluye a los géneros: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* (renombrada *Ensifer*), *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Methylobacterium* (*M. nodulans*), *Devosia* (*D. neptuniae*) y *Ochrobactrum* (*O. cytisi* y *O. lupini*). Dentro de las  $\beta$ -proteobacterias se han descrito especies de los géneros *Burkholderia*, *Cupriavidus* (*C. taiwanensis*) y *Herbaspirillum* (*H. lusitanum*) (<http://edzna.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy/node/4>).

En la mayoría de los rizobios, los genes simbióticos (genes *nod*, *nif* y *fix*) se encuentran dentro de plásmidos transmisibles o en islas simbióticas que funcionan como vehículos de transferencia horizontal de la información genética entre bacterias. Una de las hipótesis sobre el origen de cepas nodulantes dentro de las  $\beta$ -proteobacterias, afirma que éstas serían el resultado de un evento o suma de eventos de transferencia de genes simbióticos (Lloret y Martínez-Romero, 2005).

### 1.3.1. *Rhizobium tropici*

Las bacterias capaces de nodular trébol, arveja y poroto solían agruparse bajo una misma especie denominada *R. leguminosarum*. Esta especie se subdividía en biovariedades, las cuales se denominaban biovar *trifolii*, biovar *phaseoli* y biovar *viciae*, referido a si nodulaban respectivamente cada una de las leguminosas mencionadas (Jordan, 1984). Sin embargo, al investigar los rizobios que se asociaban al poroto común (*Phaseolus vulgaris* L), se descubrió que este grupo era heterogéneo. El empleo de herramientas moleculares y características fenotípicas permitió definir dos nuevas especies independientes de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*: *Rhizobium tropici* y *Rhizobium etli* (Martínez-Romero y col., 1991).

Las cepas de *R. tropici* han sido aisladas de áreas tropicales. Esta especie incluye bacterias capaces de asociarse “promiscuamente” con un amplio espectro de leguminosas. Tienen la capacidad de nodular y fijar nitrógeno al asociarse con plantas

de *Leucaena leucocephala*, *Leucaena esculenta*, *Phaseolus vulgaris*, *Gliricidia maculata* y *Gliricidia sepium*, pero también se han aislado de otras leguminosas (Martínez-Romero y col., 1991; 2002).

Este trabajo de tesis se desarrolló con la cepa modelo de *R. tropici* subgrupo B, CIAT899. Como otras cepas del subgrupo B, CIAT899 tiene la capacidad de tolerar varios tipos de estrés abiótico, incluyendo la presencia de metales pesados, altas temperaturas, bajo pH y alta salinidad (Martínez-Romero y col., 1991; Graham y col., 1994). Se han identificado ocho genes involucrados en la tolerancia al estrés salino, los cuales también serían fundamentales en el establecimiento de una simbiosis efectiva (Nogales y col., 2002). Estas características hacen a *R. tropici* una especie particular en relación a los rizobios estudiados, que podría manifestar mecanismos fisiológicos de adaptación diferentes a los ya conocidos.

#### 1.4. Intercambio de señales entre el rizobio y la leguminosa

Los nódulos son las estructuras especializadas donde se lleva a cabo la FBN. Su formación es producto de un proceso complejo que involucra intercambios moleculares y procesos de señalización entre el microsimbionte y su leguminosa hospedera. Este proceso se detalla a continuación.

La rizósfera puede definirse como la porción de suelo asociada inmediatamente a las raíces de plantas. Posee propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes a las del resto del suelo, que hacen de ella un ambiente particularmente adecuado para el crecimiento de microorganismos. Las raíces de las plantas exudan diferentes compuestos orgánicos a la rizósfera como carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos y derivados fenólicos, los cuales son consumidos por diversos microorganismos (Bowen y Rovira, 1999). Las leguminosas atraen a los rizobios simbioses específicos principalmente a través del exudado de compuestos fenólicos del tipo flavonoides (derivados de 2-fenil-1, 4-benzopirona), que son producidos como resultado del metabolismo secundario de la planta. Los flavonoides son la primera señal que reciben los rizobios de su leguminosa hospedera, estimulando su migración hacia la superficie radical. Estudios previos han demostrado que estos compuestos juegan un rol multifuncional en la comunicación planta-microorganismo y planta-planta a nivel de la rizósfera (Downie, 1994; Spaink, 2000).

Los flavonoides interactúan con la proteína NodD bacteriana, la cual es miembro de la familia LysR de reguladores transcripcionales (Broughton y col., 2000). La proteína NodD posee la habilidad de reaccionar ante flavonoides específicos. Por lo tanto, determina el rango de plantas que cada especie de rizobio puede nodular. Una vez activada por los flavonoides, la proteína NodD se une a una secuencia de ADN consenso conocida como “caja *nod*”, ubicada en las regiones promotoras de genes implicados en la nodulación (genes *nod*). De este modo, activa la transcripción de los genes *nod*, los cuales codifican para los factores Nod (Perret y col., 2000).

Los factores Nod son lipo-oligoquitosácaridos con una estructura básica común que consiste en un oligómero de unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces  $\beta$  1  $\rightarrow$  4. Este oligómero está N-acilado en su residuo terminal no reductor, unido a un ácido graso de naturaleza variable (Fig. 1). Los factores Nod son específicos de cada rizobio y pueden presentar diversos tipos de modificaciones o “decoraciones” de los extremos reductor y no reductor. La estructura básica es sintetizada por el producto de los genes *nodABC* que están presentes en todos los rizobios, y las modificaciones incluyen: metilaciones, acetilaciones, sulfataciones y glicosilaciones que pueden variar en cada especie y biovariedad de rizobio. Al igual que a NodD, a estas modificaciones también se les atribuye la especificidad o la promiscuidad de la relación rizobio-leguminosa (Perret y col., 2000).

Los factores Nod inducen a muy bajas concentraciones una serie de sucesos en la planta que llevan a la formación del nódulo (Denarie y col., 1996; Long, 1996). Esta elevada sensibilidad a ellos se debe a la presencia de receptores específicos en la raíz. En la leguminosa *Lotus japonicum* se identificaron dos receptores necesarios para reconocer la presencia de los factores Nod. Estos receptores, denominados NFR1 y NFR5, son proteínas quinasas transmembrana con dominios LysM extracelulares que reconocen a los factores Nod (ver Figura 2) (Long, 2001; Radutoiu y col., 2003).

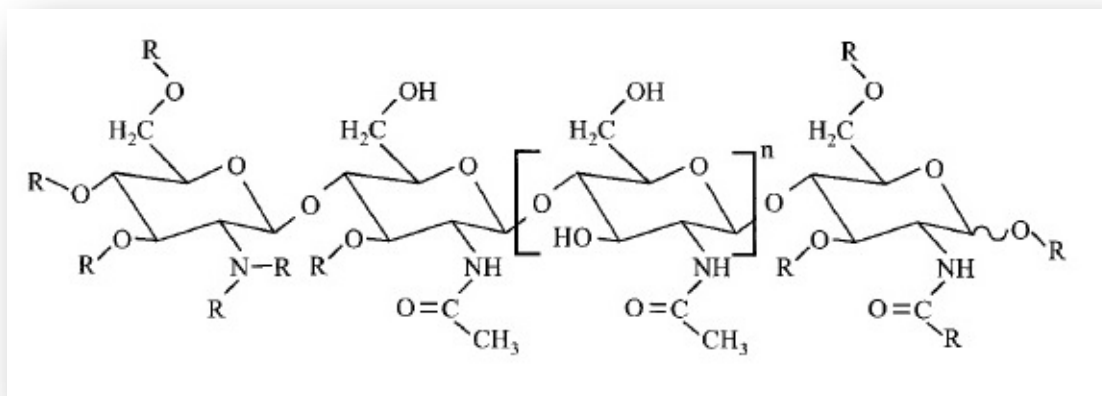


Figura 1: Estructura general de los factores Nod producidos por rizobios. R: indica los grupos variables, n: el número de repeticiones. Modificado de D'Haeze y Holsters (2002).

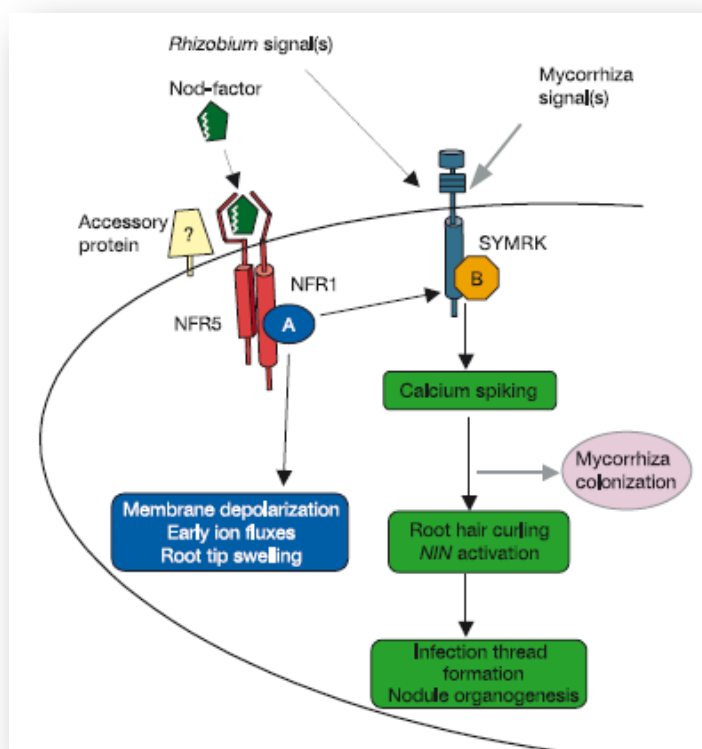


Figura 2: Modelo de la participación funcional de los receptores NFR1 y NFR5 en la percepción de las señales provenientes de rizobios y micorrizas. Figura extraído de Radutoiu y col. (2003).

Una afirmación universalmente aceptada ha sido que los factores Nod son indispensables para el establecimiento de la asociación rizobio-leguminosa. Sin embargo, estudios realizados por Giraud y colaboradores (2007) sobre el genoma de

cepas de *Bradyrhizobium* simbióticas, pusieron en duda este paradigma. La secuenciación de los genomas de *Bradyrhizobium* BTAi1 y *Bradyrhizobium* ORS278, permitió revelar la ausencia de genes *nodABC* en ellos. Análisis mutacionales sugieren que estas cepas no utilizan factores Nod, sino una vía alternativa para iniciar la simbiosis, en la cual intervendría un derivado de purina (Giraud y col., 2007).

Antes del conocimiento de las señales mencionadas, se consideraba que las lectinas de las plantas y los polisacáridos bacterianos participaban en el reconocimiento mutuo. Las lectinas actuarían como puntos de anclaje para las bacterias (Hirsch, 1999). Los polisacáridos superficiales de los rizobios, particularmente exopolisacáridos y lipopolisacáridos, participarían en varias funciones: formación del hilo de infección, liberación del rizobio desde hilo de infección, invasión y desarrollo del nódulo, desarrollo del bacteroide, estimulación del desarrollo de la planta, supresión de las respuestas de defensa de la planta y protección contra compuestos antimicrobianos. (Skorupska y col., 2006).

#### 1.5. Respuesta de la leguminosa a los factores Nod

Al ser percibidos por la planta hospedera, los factores Nod inducen en ella una serie de cambios fisiológicos y morfológicos. Estos compuestos promueven cambios celulares en la raíz y son requeridos durante las etapas tempranas de la interacción para el desarrollo de los hilos de infección y la invasión en la célula vegetal.

Dentro de las respuestas inducidas en los pelos radicales se observaron cambios en el pH intracelular, despolarización de la membrana plasmática y oscilaciones periódicas intracelulares del ión calcio. Los factores Nod inducen alteraciones en el flujo de ciertos iones como potasio, cloro, calcio y protones a través de la membrana del pelo radical, provocando su despolarización. El calcio es un «segundo mensajero», que en este caso participaría en cascadas de señalización en respuesta a los factores Nod. Las oscilaciones del calcio afectan a una gran variedad de eventos celulares, y son responsables finalmente de los cambios morfológicos en la planta (Cárdenas y col., 2000). Además de estas respuestas, los factores Nod inducen modificaciones en el citoesqueleto de los pelos radicales, por arreglos de los microfilamentos de actina y de los microtúbulos (Cárdenas y col., 1998). También ha sido reportado el aumento en la expresión de un gran número de genes de la planta, entre los que se incluyen aquellos

que codifican para las proteínas denominadas nodulinas (Van Kammen, 1984). Estas proteínas están involucradas en el desarrollo y funcionamiento del nódulo y se las agrupa en tempranas y tardías (Delauney y Verma, 1988).

Las nodulinas tempranas causan el encurvamiento del ápice de los pelos radicales alrededor de la bacteria y estimulan la división de las células corticales de la raíz para formar el primordio del nódulo. En la zona de contacto rizobio-pelo, ocurre la hidrólisis de la pared celular vegetal, la membrana plasmática se invagina y un nuevo depósito de pared celular se lleva a cabo formando una estructura tubular, denominada hilo de infección (*infection thread*, IT) (Mylona y col., 1995). La bacteria se multiplica dentro del IT, que se extiende más allá de la base del pelo radical hasta alcanzar las células del nódulo en formación (Kijne, 1975; Roth y Stacey, 1989). Cuando la bacteria alcanza el primordio del nódulo, infecta algunas de sus células. En las subfamilias de leguminosas *Mimosoideae* y *Papilionoideae*, los rizobios son liberados en el citoplasma por un proceso similar a la endocitosis (Kijne, 1975). Durante este proceso las bacterias son rodeadas por una membrana derivada del huésped, conocida como membrana peribacteroide (MPB) (Robertson y Lyttleton, 1982; Roth y col., 1988). A partir de ese evento, la bacteria se divide unas cuantas veces más hasta diferenciarse a la forma simbiótica fijadora de nitrógeno, denominada bacteroide (Patriarca y col., 2002). En este proceso, el bacteroide está rodeado individualmente o en pequeños grupos por la MPB. Al compartimiento compuesto por el o los bacteroides y la MPB se lo denomina simbiosoma (Roth y col., 1988). Mientras ocurren estos cambios, aumenta la expresión de las nodulinas tardías, como es el caso de la leghemoglobina.

#### 1.5.1. Nódulos determinados e indeterminados

Según la morfología, los investigadores han distinguido dos tipos de nódulos: los indeterminados y determinados (Fig. 3). Esta característica depende de la planta (Michiels y Vanderleyden, 1994). El nódulo indeterminado se origina a partir de divisiones celulares en la corteza interna, tiene un meristema apical persistente y una forma cilíndrica típica (Vasse y col., 1990). Debido a la continua actividad del meristema, las células del nódulo forman un gradiente de desarrollo desde el meristema distal al proximal de la raíz. Durante el desarrollo de estos nódulos, cada simbiosoma contiene un solo bacteroide diferenciado. Suelen encontrarse en leguminosas de climas templados como en *Medicago*, *Pisum*, *Trifolium* y *Vicia*. El nódulo determinado se

origina a partir de la división de células en la corteza externa, no tiene un meristema persistente y es de forma esférica. En este caso, el meristema cesa la división en una etapa temprana del ciclo y por esta razón las células del nódulo se encuentran en un estado similar del desarrollo. En estos nódulos, los simbiosomas contienen más de un bacterioide. Las leguminosas tropicales como *Phaseolus*, *Glycine* y *Lotus* forman nódulos determinados (Allen y Allen, 1953; Rolfe, 1988; Patriarca y col., 2002; Tesis de Doctorado A. L. D'Antuono, 2006).

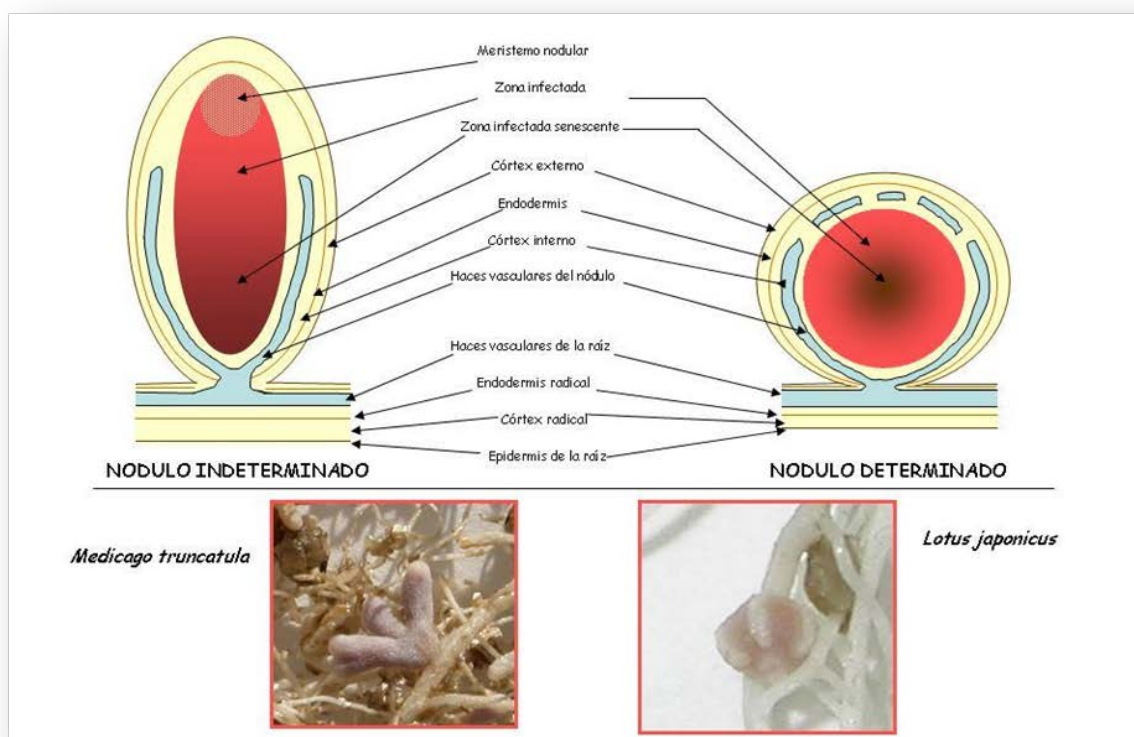


Figura 3: Esquema correspondiente a nódulos determinados e indeterminados desarrollados en leguminosas. Figura extraída de <http://www.unavarra.es/>.

### 1.6. Metabolismo del carbono en rizobios

En general, en condiciones de vida libre, los rizobios metabolizan los azúcares mediante las vías de Entner-Doudoroff y de pentosa fosfato (PP), participando también enzimas pertenecientes a la vía gluconeogénica (Arias y col., 1979; McKay, 1988). Los rizobios expresan las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATCs) y algunos

podrían utilizar la vía del glioxilato (Keele y col., 1969, 1970; Green y Emerich, 1997). Por otro lado, varios autores afirman que los mutantes de rizobio defectivos en el catabolismo de azúcares forman nódulos efectivos en todas las simbiosis analizadas, y en bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum* se comprobó que los azúcares no estimulan la actividad Nitrogenasa (Bergersen y Turner, 1967, Arias y col., 1979; Ronson y Primrose, 1979; Glenn y col., 1984). En correlación con esto, las cepas de rizobio incapaces de transportar y/o metabolizar ADCs forman nódulos inefectivos (Fix<sup>-</sup>) (Finan y col., 1983; Bolton, 1986; Slooten y col., 1992). Está ampliamente comprobado que los ADCs son la fuente de carbono proporcionada a los bacteroides y que son metabolizados vía el ciclo de los ATCs (Bergersen y Turner, 1967).

### 1.7. Metabolismo del carbono en bacteroides

La fuente de carbono requerida por los bacteroides Fix<sup>+</sup> proviene de los fotosintatos de la planta y es transportada a los nódulos a través del floema como sacarosa (Gordon y col., 1999). Aunque se ha demostrado que la FBN depende de la energía proporcionada por el metabolismo de la sacarosa, los carbohidratos no son directamente consumidos por los bacteroides. La MPB delimita el simbiosoma y de esta forma juega un papel esencial, controlando el intercambio de metabolitos entre los bacteroides y la planta hospedera.

En los nódulos se expresa un gran número de genes de la planta y la bacteria. Algunos de los productos están localizados en la MPB y en la membrana citoplasmática del bacteroide (Fortin y col., 1985; Miao y col., 1992). Existen varios transportadores de azúcares expresados en la MPB de *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula* (Colebatch y col., 2002). Sin embargo, la actividad de transporte de azúcares a través de la MPB sólo ha sido demostrada en *P. vulgaris*. En otras asociaciones el transporte solo ocurriría vía difusión, porque el nivel de actividad no sería suficiente para sustentar la FBN. Por lo tanto, se sugirió que el simbiosoma sería capaz de incorporar azúcares principalmente por difusión (White y col., 2007). Por otro lado, la MPB así como también la membrana citoplasmática del bacteroide contienen un transportador específico para ADCs (White y col., 2007). Esto apoya la idea de que los azúcares no serían la principal fuente de carbono y energía para el bacteroide, sino los ADCs como se mencionó previamente.

### 1.7.1. Provisión de carbono al bacteroide

El modelo clásico propone que las células vegetales no infectadas de los nódulos incorporan y metabolizan la sacarosa a ácidos orgánicos, tales como los ADCs, que son luego descargados al apoplasto o posiblemente transferidos a través del transporte simplástico directamente a las células infectadas para su consumo por los bacteroides. Esta afirmación se apoya en parte en los estudios que comprobaron que la baja tensión de oxígeno existente en las células infectadas no permitiría la respiración mitocondrial. Por lo tanto, estas células no podrían suplir a los bacteroides con el ATP necesario para la FBN (Rawsthorne y LaRue, 1986).

La sacarosa puede ser hidrolizada por la enzima sacarosa sintasa (SS) en UDP-glucosa y D-fructosa, o por la invertasa alcalina (AI) en D-glucosa y D-fructosa. La actividad de las enzimas SS y AI es mayor en las células infectadas del nódulo que en las demás células de la raíz. En mutantes SS<sup>-</sup> de *Pisum sativum*, que pierden la actividad enzimática, se observó que inducen la formación de nódulos pero estos son inefectivos, lo que indica que la enzima SS es esencial para el proceso de fijación de nitrógeno (Gordon y col., 1999). Mientras la importancia de la enzima SS sería absoluta, la de la enzima AI aún no se conoce con claridad. Se detectó actividad SS en nódulos de soja (Thummler y Verma, 1987), poroto (Kuster y col., 1993) y *Medicago truncatula* (Hohnjec y col., 1999), conjuntamente con otras enzimas de la vía glicolítica. Además, en estos casos, las actividades enzimáticas de la vía glicolítica eran superiores en nódulos en comparación con las de las raíces sin infectar (Reibach y Streeter, 1983).

Los productos generados por el metabolismo de la sacarosa serían derivados para la síntesis de celulosa y almidón o metabolizados por las enzimas glicolíticas para producir fosfoenolpiruvato (PEP), que podría ser carboxilado a oxalacetato (OAA), mediando la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC). Luego, el OOA sería reducido por la malato deshidrogenasa (MDH) a malato. Este ácido sería la principal fuente de carbono suministrada a los bacteroides (Tesis de Ph.D de E. M. Lodwig, 2001) (Fig. 4). En nódulos de soja, alfalfa, arveja y lenteja existe una elevada actividad PEPC en relación a las demás células de la raíz, indicando que cumpliría un papel fundamental en el metabolismo del carbono en el nódulo (Pathirana y col., 1992; Vance y Gantt, 1992; Chopra y col., 2002).

Las concentraciones de ADCs en los nódulos son altas, y experimentos de

marcado con  $^{14}\text{CO}_2$  demostraron una alta producción o volumen de estos compuestos, ya que el  $^{14}\text{C}$  fue rápidamente incorporado en los bacteroides, primeramente como malato (Salminen y Streeter, 1992).

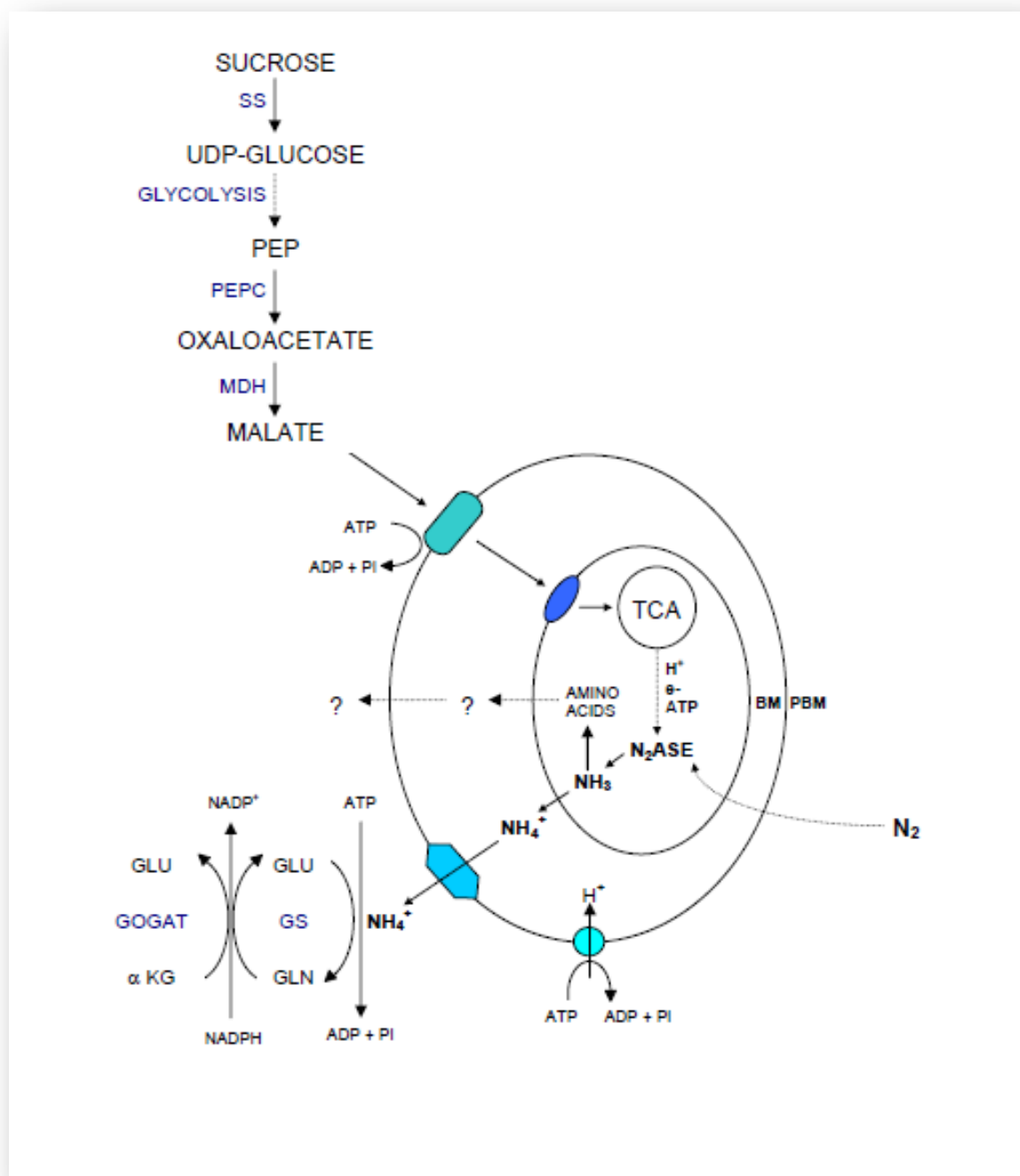


Figura 4: Esquema representativo del metabolismo del carbono dentro del nódulo y el intercambio de nutrientes entre un bacteroide fijador de nitrógeno y la célula vegetal. Figura extraída de la Tesis de Ph.D de E. M. Lodwig (2001).

### 1.7.2. Ciclo de los ATCs en bacteroides

La oxidación de compuestos mediante el ciclo de los ATCs (Fig. 5) proporciona equivalentes de reducción, ATP y metabolitos para la producción de aminoácidos y otras vías biosintéticas. Este ciclo, además de ser la fuente principal de energía al oxidar acetil-CoA, también suministra varios sustratos necesarios para la biosíntesis en organismos aerobios. Debido a que esta ruta metabólica es un ciclo, es necesario mantener ciertas concentraciones de los intermediarios para que no se detenga. Las reacciones conocidas como anapleróticas generarían los sustratos requeridos para mantener el normal funcionamiento del ciclo.

Algunas de las enzimas anapleróticas presentes en rizobio son: la enzima málica, que cataliza la carboxilación reductiva del piruvato a malato, la PEPC, que genera oxalacetato a partir de piruvato y simultáneamente hidroliza ATP, y la piruvato carboxilasa (Dunn, 1998).

La porción tricarboxílica del ciclo de los ATCs se inicia a partir de la reacción del OAA con el acetil-CoA, para formar finalmente el 2-oxoglutarato. El primer paso del ciclo abarca la condensación de OAA y acetil-CoA, reacción catalizada por la enzima citrato sintasa (CS), resultando en la síntesis de citrato. *R. tropici* tiene dos genes CS, uno localizado en el plásmido simbiótico (*pcsA*) y otro en el cromosoma (*ccsA*). Un mutante *ccsA* de *R. tropici* CFN299 presentó actividad CS y capacidad de nodulación disminuida, aunque fijaba nitrógeno. Un mutante doble CS (*ccsA*<sup>-</sup>*pcsA*<sup>-</sup>) indujo la formación de nódulos inefectivos (Hernández-Lucas y col., 1995b). En contraste con esta cepa de *R. tropici*, *Sinorhizobium meliloti* y *B. japonicum* parecen tener un único gen que codifica para la CS. Clones mutantes en este gen (*gltA*) en *S. meliloti* exhibieron alteraciones en la composición de polisacáridos de la superficie celular y produjeron nódulos carentes de bacteroides al nodular alfalfa. Por esta razón, se ha sugerido que los defectos simbióticos mostrados por este mutante serían resultado de alteraciones en el proceso de infección más que del metabolismo del carbono del bacteroide (Mortimer y col., 1999).

La enzima aconitasa cataliza la isomerización reversible de citrato a isocitrato. Por último, la enzima isocitrato deshidrogenasa, que es codificada por el gen *icd*, cataliza la formación de 2-oxoglutarato a partir de isocitrato. Los mutantes *icd* de *B. japonicum* fueron capaces de fijar nitrógeno en un nivel similar al de la cepa salvaje

durante su asociación con plantas de soja. Por el contrario, mutantes *icd* de *S. meliloti*, forman nódulos inefectivos (Green y col., 1998). En conclusión, existiría una gran diversidad en el metabolismo de los ATCs entre distintos rizobios.

La porción dicarboxílica del ciclo de los ATCs consiste de cinco reacciones que generan OAA desde 2-oxoglutarato. La vía es iniciada por el complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa (OGDH), que cataliza la decarboxilación oxidativa del 2-oxoglutarato a succinil-CoA. Los genes *sucAB* de *R. leguminosarum* y *B. japonicum* codifican para el componente OGDH (E1) y el componente dihidrolipoamida succiniltransferasa (E2) respectivamente, que catalizan la reacción mencionada. En varios rizobios, tal como *R. leguminosarum* y *B. japonicum*, los genes *sucAB* están acoplados transcripcionalmente a *mdh* y *sucCD*, formando un operón. El gen *mdh* codifica para la enzima MDH (mencionada previamente) y el gen *sucCD*, codifica para la enzima succinil-CoA sintetasa (SCS), que cataliza la hidrólisis de succinil-CoA a succinato. Mutantes *sucAB* de *R. leguminosarum* no fueron capaces de formar nódulos eficientes. Sin embargo, mutantes *sucA* de *B. japonicum*, exhibieron dificultades en el proceso de nodulación de plantas de soja, pero los nódulos formados fueron capaces de fijar nitrógeno en un nivel similar al de la cepa salvaje (Poole y col., 1999; Dymov y col., 2005). Los resultados obtenidos permitieron afirmar que en *B. japonicum* estaría funcionando un ciclo de los ATCs alternativo (se discutirá en la sesión 1.7.3).

Los genes *sdhC*, *sdhD* y *sdhB* codifican para proteínas que forman el complejo succinato deshidrogenasa (SDH) que cataliza la deshidrogenación de succinato a fumarato. Los mutantes SDH<sup>-</sup> de *S. meliloti* y *R. leguminosarum* exhibieron poco o ningún crecimiento en succinato pero crecieron bien en presencia de malato o fumarato como única fuente de carbono (Gardioli y col., 1987). Los nódulos de plantas asociadas con estos mutantes contenían bacteroides incapaces de fijar nitrógeno (White y col., 2007). La siguiente reacción en el ciclo está a cargo de la enzima fumarasa, que cataliza la hidratación de fumarato, dando lugar a la formación de malato.

El paso final en el ciclo de los ATCs regenera el OAA desde el malato y es catalizado por la enzima MDH. El crecimiento bajo condiciones limitadas de oxígeno resultó en poca o ninguna disminución en la actividad MDH en rizobios en vida libre y fue muy alta en bacteroides (McKay y col., 1989). Como se mencionó previamente, parte de la energía obtenida como resultado del ciclo de los ATCs sería utilizada por el

bacterioide en la FBN. El amonio obtenido como producto principal de la FBN es exportado al citoplasma de la célula vegetal, donde es asimilado por la planta (Colebatch y col., 2002).

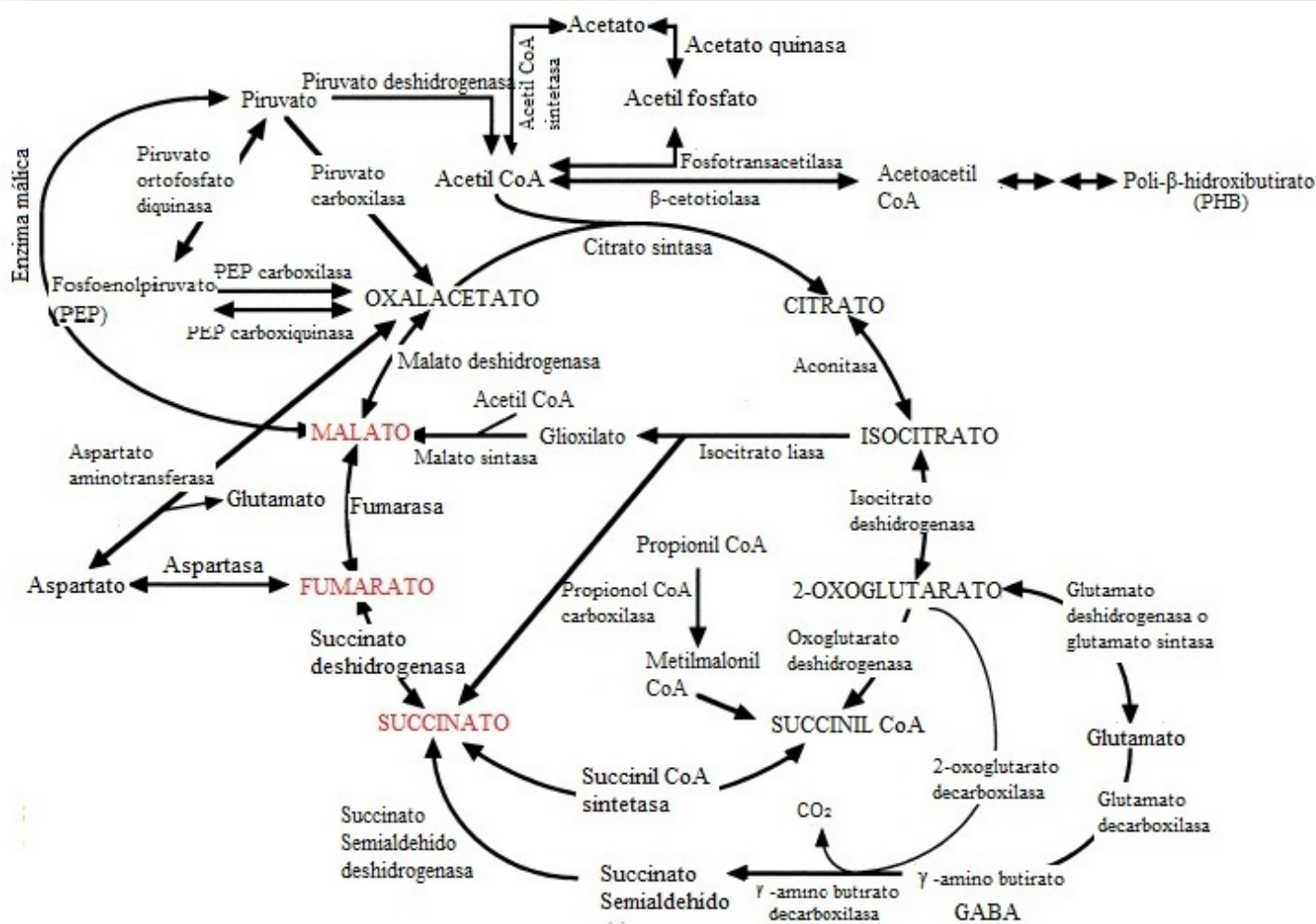


Figura 5: Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATCs). Figura extraída de Dunn (1998).

#### 1.7.2.1. Síntesis de Acetil-CoA

En la síntesis de citrato es claro que el OAA deriva del malato, succinato y fumarato proporcionado por la planta. Sin embargo, el acetil-CoA se generaría a partir de varias vías. En ciertas condiciones, el malato es oxidativamente descarboxilado por una enzima málica a piruvato y éste es convertido a acetil-CoA por la piruvato

deshidrogenasa (PDH) (McKay y col., 1988; Driscoll y Finan, 1993). En los rizobios hay dos formas de la enzima málica, una dependiente de  $\text{NADP}^+$  y la otra dependiente de  $\text{NAD}^+$ . La enzima málica dependiente de  $\text{NAD}^+$  es esencial para la FBN. Esta enzima es altamente expresada en rizobios en estado de vida libre y en bacteroides (Driscoll y Finan, 1997). Finalmente, la PDH es un complejo multienzimático codificado por dos genes, *pdhA $\alpha$*  y *pdh $\beta$*  en *S. meliloti* (Cabanés y col., 2000).

El acetil-CoA también puede ser derivado desde el poli  $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), un poliéster sintetizado por varios rizobios. La degradación del PHB es iniciada por la despolimerización del polímero, catalizada por la PHB depolimerasa para formar  $\beta$ -hidroxibutirato. Este último es oxidado a acetoacetato, reacción catalizada por la hidroxibutirato deshidrogenasa. El acetoacetato es convertido a acetil-CoA en dos pasos, en los cuales intervienen las enzimas acetoacetil-CoA sintetasa y  $\beta$ -cetotiolasa.

El acetil-CoA también puede ser sintetizado desde acetato en una reacción catalizada por la acetato quinasa y fosfotransacetilasa o por una acetil-CoA sintetasa (Dunn, 1998). Las actividades de estas tres enzimas han sido detectadas en bacteroides de *B. japonicum* y se supone que contribuyen en la producción de acetil-CoA. Por el contrario, en otros rizobios como *S. meliloti*, los bacteroides fueron incapaces de metabolizar el acetato. Además, los bacteroides de *S. meliloti* mutantes en los genes de la acetato quinasa y fosfoatransacetilasa no mostraron cambios en el fenotipo simbiótico con respecto a la cepa salvaje (Preston y col., 1989; 1990). Esto indicaría que el acetato no es utilizado como sustrato en la síntesis de acetil-CoA en *S. meliloti* como si ocurriría en *B. japonicum*.

### 1.7.3. El ciclo de los ATCs puede funcionar de forma incompleta en algunos bacteroides

La funcionalidad del ciclo de los ATCs en bacteroides de soja fue confirmada por primera vez en los años 70'. Stovall y Cole (1978) demostraron la presencia de las enzimas del ciclo de los ATCs en bacteroides de *B. japonicum*. Desde entonces, la actividad del ciclo de los ATCs ha sido confirmada en *B. japonicum*, *R. leguminosarum*, *S. meliloti*, *R. tropici* y *Mesorhizobium ciceri*. Debido a que los ADCs son el único recurso de carbono para los bacteroides y son metabolizados por el ciclo de los ATCs, se esperaría que este ciclo operara completamente. Por el contrario, aunque los

bacteroides expresan todas las enzimas, se afirma que el ciclo de los ATCs no opera en su capacidad total. Análisis mutacionales confirmaron que un ciclo de los ATCs totalmente funcional no sería esencial para la FBN en rizobios de crecimiento lento como *B. japonicum* (Thony-Meyer y Kunzler, 1996). Sin embargo, rizobios de crecimiento rápido, tales como *S. meliloti* y *R. leguminosarum*, necesitarían un ciclo de los ATCs completo (McDermott y Kahn, 1992). El ciclo de los ATCs en bacteroides probablemente opera por debajo de su potencial aerobio total debido a las condiciones microaerobias presentes en los nódulos, que limitan la habilidad de la cadena respiratoria para oxidar los nucleótidos reducidos (Karr y Emerich, 2000; Tabrett y Copeland, 2000).

La baja tensión de oxígeno existente dentro del nódulo provoca un aumento del poder reductor ( $\text{NADH/NAD}^+$ ) y como consecuencia algunos pasos del ciclo pueden ser inhibidos. Esta inhibición requiere la existencia de vías alternativas *by-pass* que podrían funcionar en algunos bacteroides para mantener un equilibrio redox óptimo y el balance de los compuestos carbonados en el ciclo de los ATCs. Entre las vías *by-pass* se encuentran: la síntesis de PHB, la glucogénesis y la vía GABA (McDermott y col., 1989).

En el bacteroide, una de las enzimas del ciclo de los ATCs que es particularmente sensible a la inhibición es la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (OGDH). Algunos investigadores sugirieron que la vía del  $\gamma$ -aminobutirato (GABA) podría actuar como vía *by-pass* en este paso del ciclo. En esta vía, el 2-oxoglutarato es convertido a glutamato, que es luego descarboxilado a GABA, reacción catalizada por la enzima glutamato descarboxilasa. GABA es luego transaminado para formar succinato semialdehído. Luego, la enzima succinato semialdehído deshidrogenasa (SSDH) cataliza la oxidación del succinato semialdehído a succinato y así se reintegra al ciclo de los ATCs. La actividad glutamato descarboxilasa fue elevada en *S. meliloti* (Green y col., 2000). Además, estudios realizados con mutantes de *S. meliloti* confirmaron la necesidad de actividad SSDH en los bacteroides para la FBN (Fitzmaurice y O’Gara, 1993). Por el contrario, en otros rizobios como *B. japonicum*, la actividad glutamato descarboxilasa fue muy baja, lo que sugiere que la vía GABA no sería suficiente para compensar la inhibición de la OGDH. En bacteroides de *B. japonicum* se demostró la presencia de una elevada actividad 2-oxoglutarato descarboxilasa, que junto a la SSDH formarían una vía *by-pass* de la enzima OGDH, permitiendo al ciclo de los ATCs

funcionar bajo condiciones que lo inhibirían. La enzima 2-oxoglutarato carboxilasa catalizaría la formación de succinato semialdehído a partir del 2-oxoglutarato (Fig. 5). En *M. loti* y *R. leguminosarum*, también se detectó la presencia de las enzimas 2-oxoglutarato descarboxilasa y SSDH, lo que sugiere que esta vía *by-pass* sería utilizada por diversos rizobios (Dunn, 1998; Grenn y col., 2000).

Al contrario de lo que ocurre en algunos rizobios (Duncan y Fraenkel, 1979; Walshaw y col., 1997), los mutantes en los genes que codifican para el complejo OGDH de *B. japonicum* formaron nódulos que presentaban alteraciones en su desarrollo y en la FBN (Green y Emerich, 1997). Aun así, estos mutantes pudieron fijar nitrógeno en el nódulo a un nivel similar al de la cepa salvaje debido a la existencia de estas vías *by-pass* funcionando en los bacteroides (Green y col., 2000).

### 1.8. Sistema de transporte de ADCs en rizobio

Como se mencionó previamente, los ADCs son esenciales para el proceso de FBN por el rizobio alojado en el nódulo de la leguminosa. Por lo tanto, el transporte y catabolismo de estos compuestos son dos funciones necesarias para el mantenimiento de una simbiosis eficiente. Los ADCs como malato, succinato, fumarato, aspartato y oxalacetato son producidos y consumidos por varios microorganismos. En rizobios, estos metabolitos pueden ser metabolizados mediante el ciclo de los ATCs y también pueden ser usados como intermediarios para la formación de piruvato y posterior curso a la gluconeogénesis.

El transporte de los ADCs en los rizobios está mediado por un sistema denominado Dct. Mediante análisis mutacionales y la secuenciación de genomas, se ha revelado la presencia del sistema Dct en la mayoría (sino en todos) los rizobios que han sido estudiados (Watson y col., 1988; Jiang y col., 1989; Engelke y col., 1989).

El sistema Dct consta de tres genes: *dctA*, que codifica para la proteína de transporte DctA, y *dctB* y *dctD*, divergentes respecto a *dctA*. Los genes *dctB* y *dctD* codifican para un sistema sensor-regulador de dos componentes (DctBD), que responde a la presencia de ADCs en el medio y activa la expresión del gen *dctA*. DctB es una proteína integral de membrana citoplasmática que actúa como proteína sensor. DctD es una proteína citoplasmática que actúa como regulador de respuesta (Ronson y col., 1984; Watson y col., 1988; Jording y col., 1992). En *R. leguminosarum*, *dctB* y *dctD*

componen una única unidad transcripcional, mientras en *S. meliloti*, *dctD* tendría su propio promotor (Yarosh y col., 1989; Watson, 1990; Jording y col., 1992). La comparación de las regiones promotoras de *dctA* en *S. meliloti* y *R. leguminosarum* permitió identificar un alto grado de similitud entre las regiones pero, en contraste con *R. leguminosarum*, dos posibles codones de inicio (ATG) fueron identificados en *S. meliloti*, precedido por un sitio consenso de unión al ribosoma (Jiang y col., 1989). El segundo de estos ATG es el conservado entre estas dos especies y ha sido sugerido como el sitio más probable de inicio de la transcripción (Engelke y col., 1989; Wang y col., 1989). En la Figura 6 se esquematiza la organización de los genes *dctABD* en *S. meliloti* (Jiang y col., 1989).

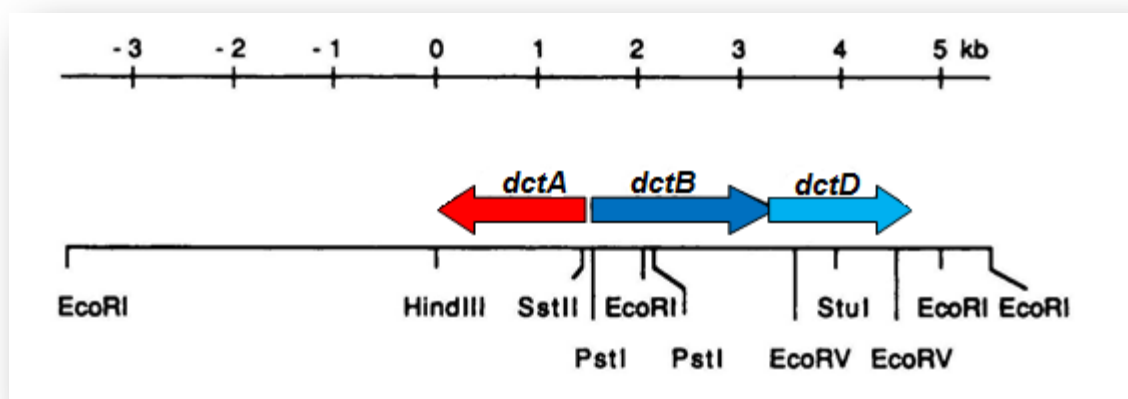


Figura 6: Organización de los genes *dct* en *S. meliloti*. Figura modificada de Jiang y col. (1989).

En *R. leguminosarum*, la transcripción desde el promotor del gen *dctA* es dependiente de la unión del factor  $\sigma^{54}$  (asociado a la ARN polimerasa) en la secuencia de ADN que se encuentra a 93 pares de bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. DctD fosforilada es capaz de unirse a una posición cercana a la de la unión del factor  $\sigma^{54}$  por medio de su motivo hélice- $\alpha$ -hélice C-terminal, para interactuar con él y con la subunidad  $\beta$  de la ARN-polimerasa. Como resultado, se induce la expresión del gen *dctA* (Jording y col., 1993; Lee y col., 1994; Wang y col., 1997; Reid y Poole, 1998) (Fig. 7).

En *S. meliloti* y *R. tropici*, los genes *dct* se encuentran en un megaplásmido. En *R. leguminosarum* están localizados en el cromosoma, cerca de los genes que codifican para la producción de lipopolisacáridos (Watson y col., 1988; Poole y col., 1994; Batista y col., 2001).

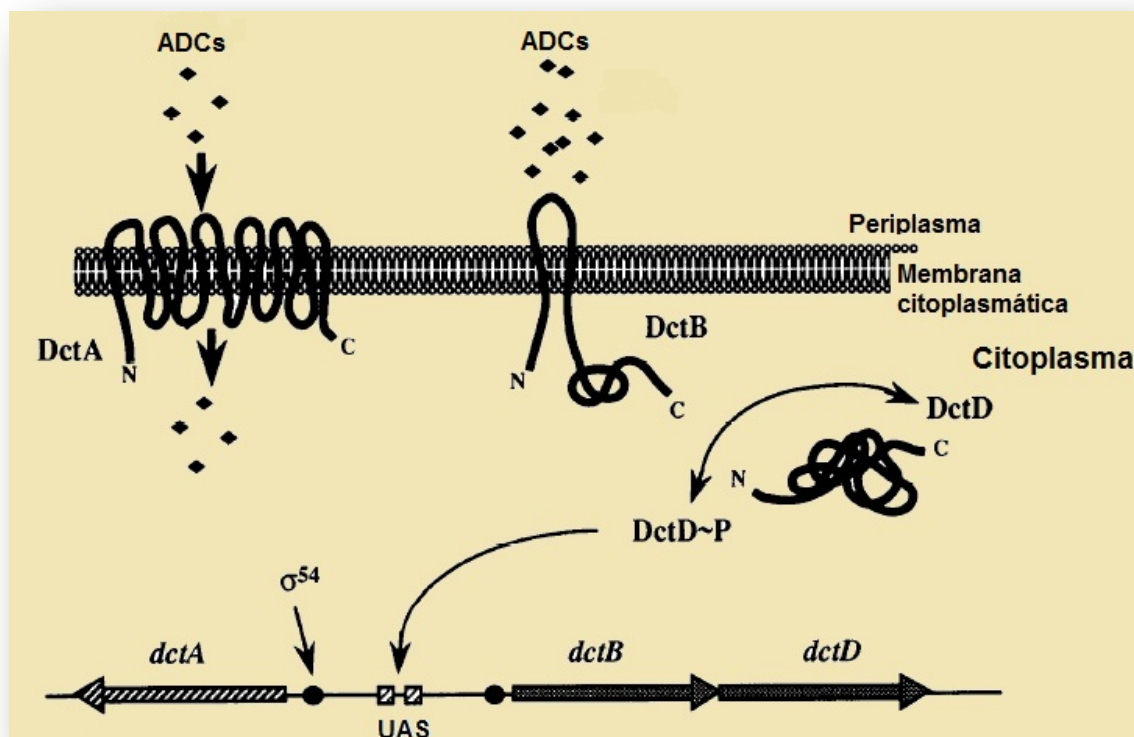


Figura 7: Sistema de transporte de ADCs en rizobio. DctD-P: proteína DctD unida a un grupo fosfato; UAS: secuencias activadoras de unión a DctD-P;  $\sigma^{54}$ : factor sigma 54. Figura extraída de Geblin y col. (1996).

### 1.8.1. Transportador de ADCs

La permeasa DctA de rizobio presenta características comunes a las de los transportadores DctA de otras bacterias. DctA pertenece a un subgrupo de la familia de transportadores de glutamato, denominada: familia de transportadores de  $C_4$ -dicarboxilatos de bacterias o la familia dicarboxilato/aminoácido:cación simporte (DAACS) (Saier, 2006). La familia de transportadores de glutamato consiste de tres grupos, basado en su especificidad de sustrato: transportadores de  $C_4$ -dicarboxilatos de bacterias, transportadores de aspartato/glutamato en eucariotas y bacterias, y transportadores de aminoácidos neutros. Los sustratos para los transportadores de  $C_4$ -dicarboxilatos son malato, fumarato, succinato, aspartato, orotato y alguno de sus análogos (Yurgel y Kahn, 2004). DctA es un transportador simporte de  $C_4$ -dicarboxilatos-cationes ( $H^+$  o  $Na^+$ ) de aproximadamente 450 aminoácidos. Es una

proteína integral de membrana citoplasmática, que contiene diez  $\alpha$ -hélices transmembrana, con el dominio N-terminal y C-terminal localizados en el citoplasma (Jording y Puhler, 1993; Janausch y col., 2002).

Los rizobios de vida libre deficientes en la permeasa DctA no crecen en ADCs como succinato, malato, fumarato u oxoglutarato como únicas fuentes de carbono. Estos mutantes *dctA* pueden utilizar otras fuentes de carbono de forma normal, observándose una reducción en la respuesta quimiotáctica al succinato. Por lo tanto, en condiciones de vida libre el sistema *dct* no sería esencial para la sobrevivencia del rizobio. En contraste, los ADCs cumplen un rol fundamental en simbiosis. En los mutantes *dctA* la ausencia de transporte de ADCs lleva a la formación de bacteroides que senescen rápidamente en los nódulos (Yurgel y Kahn, 2004).

#### 1.8.2. Sistema regulador de dos componentes

En la mayoría de los rizobios el sistema de dos componentes DctBD es transcrito desde un promotor constitutivo que precede al gen *dctB*. DctB es una proteína integral de membrana citoplasmática que detecta ADCs en el medio. Cuando hay ADCs en el periplasma, esta proteína se autofosforila, luego se transfiere el grupo fosfato a DctD para iniciar la transcripción de *dctA*. En rizobio, DctA es requerido para regular la actividad de DctB (Reid y Poole, 1998).

Así como los mutantes *dctA* forman nódulos inefectivos, la mayoría de las mutaciones en *dctBD* confieren este mismo fenotipo (Yurgel y Kahn, 2004). Sin embargo, en otros estudios, mutantes *dctB* o *dctD* de *S. meliloti* en asociación con *Medicago sativa* fijaron nitrógeno, por lo que se piensa que en el nódulo debería participar, además, otro sistema alternativo de regulación (Engelke y col., 1987, 1989; Boesten y col., 1998).

Los estudios desarrollados con *R. leguminosarum* mostraron que los mutantes en cualquiera de los tres genes *dct* infectaban sus plantas hospedero, pero los bacteroides morían rápidamente luego de liberarse del hilo de infección (Ronson, 1981; Finan y col., 1983; Bolton, 1986; Slooten y col., 1992). Comparados con los nódulos infectados por la cepa salvaje, aquellos inducidos por estos mutantes contenían más almidón en las células infectadas y no infectadas de la planta. Se supone que mientras la planta continúa sintetizando compuestos de carbono para suministrar a los mutantes, los precursores de carbohidratos se acumulan debido a que los bacteroides no pueden

consumir los ADCs.

### 1.9. Sistema de transporte alternativo de succinato

*R. tropici* CIAT899 contiene un *cluster* génico *dctABD* conservado (Batista, 2001). A diferencia de otros rizobios, un mutante *dctA* (GA1) de la cepa *R. tropici* CIAT899 fue capaz de crecer en medio definido al incubar las células en succinato pero no malato o fumarato como únicas fuentes carbonadas. Esto sugirió la presencia de un sistema de transporte de succinato alternativo en *R. tropici*. A partir de la cepa GA1 se obtuvieron dos nuevas cepas (GA11 y GA12), incapaces de crecer en medio definido (MM) con succinato como única fuente de carbono. Las cepas obtenidas fueron utilizadas para caracterizar un sistema de transporte de succinato alternativo (Kgt), codificado por un *cluster* de tres genes (Fig. 8). Los genes codificantes de este sistema presentaron una organización similar a los genes *dct*. El gen del *cluster* transcripto divergentemente con respecto a los otros dos tenía alto grado de similitud con el gen de una permeasa de la Major Facilitator Superfamily (MFS) de *Ochrobactrum anthropi* 49188 y de una permeasa de 2-oxoglutarato, KgtP de *Ralstonia solanacearum* GMI1000 y *Agrobacterium tumefaciens* C58. En *R. tropici*, al gen que codifica para la permeasa del sistema Kgt se lo denominó *kgtP*. El análisis fenotípico de las cepas indicó que Kgt transporta 2-oxoglutarato en *R. tropici* CIAT899 y en menor medida, también succinato en GA1. Además, la incapacidad de GA11 y GA12 de crecer en 2-oxoglutarato o succinato, sugería que los genes interrumpidos participaban en la expresión del sistema Kgt. Los genes interrumpidos en GA11 y GA12 se denominaron *kgtS* y *kgtR* respectivamente, dado que el análisis de secuencia indicaba que estaban organizados de forma consecutiva y que los mismos constituían un sistema de dos componentes sensor-regulador, que posiblemente controlaba la expresión del gen *kgtP*.

Posteriormente, a partir de las cepas CIAT899 y GA1 se construyeron mutantes *kgtP*, obteniéndose las cepas CIAT899.317 y GA1.317 respectivamente. La cepa CIAT899.317 fue capaz de crecer en succinato, fumarato y malato, indicando que el sistema Dct estaba intacto. En cambio, GA1.317 fue incapaz de crecer en succinato, malato y fumarato. Esto indicó que *kgtP* sería esencial para el transporte de succinato en GA1. Por otro lado, ambos mutantes *kgtP* crecieron en 2-oxoglutarato pero a un nivel muy inferior que la cepa salvaje. Aún GA1.317, siendo un doble mutante (*dctA<sup>-</sup> kgtP<sup>-</sup>*)

creció, aunque de forma muy reducida, en presencia de esta fuente de carbono. En cambio, los mutantes GA11 (*dctA<sup>-</sup> kgtS<sup>-</sup>*) y GA12 (*dctA<sup>-</sup> kgtR<sup>-</sup>*) no fueron capaces de hacerlo. Por consiguiente, se sugirió la presencia en *R. tropici* de otro sistema de transporte alternativo para 2-oxoglutarato en el que sería esencial la función de KgtSR (Batista, 2009).

Batista y col. (2009) analizaron la expresión del promotor del gen *dctA* en distintos contextos génicos y bajo distintas condiciones de crecimiento. En CIAT899 el promotor *dctA* fue inducido por succinato, malato o fumarato. En GA1 este promotor fue fuertemente inducido por glucosa, succinato, malato, fumarato o 2-oxoglutarato a niveles superiores a los obtenidos con la cepa salvaje. Este comportamiento fue explicado como una hipersensibilidad del sistema DctBD en ausencia de *dctA*. En los dobles mutantes, GA11 y GA12, el promotor *dctA* fue inducido en presencia de succinato y sorprendentemente con 2-oxoglutarato y mostró mayores niveles de expresión que en CIAT899. Estos resultados sugieren que KgtS y KgtR podrían influir con la función de DctB y DctD en la detección de ADCs (succinato) en ausencia de DctA. A la interferencia entre sistemas de dos componentes se lo denomina *cross-talk*. La expresión diferencial en GA1 sería consecuencia del *cross-talk* de los dos sistemas DctBD y KgtRS en ausencia del gen *dctA*.

En *P. vulgaris*, todas las cepas mencionadas indujeron la formación de nódulos. Las cepas GA1, GA11, GA12 y GA1.317 no promovieron el crecimiento vegetal, con valores de peso seco comparables a los determinados en plantas incubadas sin fuente de nitrógeno externa. En contraste, las cepas CIAT899 y CIAT899.317 indujeron el crecimiento vegetal. En conclusión, esto sugiere que DctA es esencial y no KgtP para la formación de nódulos efectivos en *P. vulgaris* (Batista, 2009).

La mayoría de los rizobios poseen el sistema Dct como único sistema de transporte, pero aparte de *R. tropici* CIAT899 existe otra excepción. *Rhizobium* NGR234 tiene dos sistemas que pueden transportar ADCs. El gen homólogo a *dctA* está localizado en el plásmido simbiótico, pero un segundo locus no caracterizado que puede conferir crecimiento en ADCs, está localizado en el cromosoma. No se encontró un homólogo a *dctB* precediendo el promotor de *dctA*. Ambos sistemas permiten que la cepa NGR234 crezca en presencia de ADCs como única fuente de carbono, pero sólo el sistema *dctA* es capaz de mantener la FBN en simbiosis (Slooten, 1992).

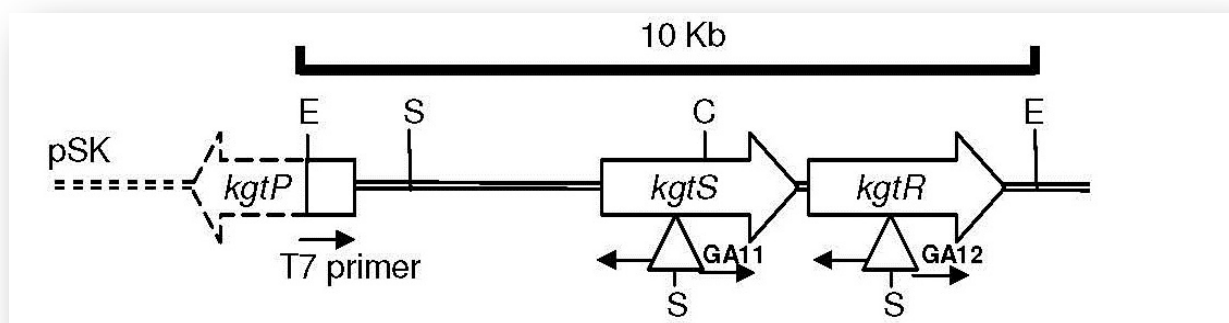


Figura 8: Organización del locus *kgt* en *R. tropici*. Los triángulos indican la localización del transposón Tn5 (utilizado en la mutagénesis al azar de GA1) en cada mutante, GA11 y GA12. Abreviaturas de los sitios de restricción: EcoRI; S, *Sal*; C, *Cla*I. Figura extraída de Batista y col. (2009).

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. Hipótesis de trabajo

Nuestra hipótesis de trabajo propone que en *Rhizobium tropici* CIAT899, la expresión del sistema de transporte Dct, específico para ADCs (malato, fumarato y succinato) y el sistema Kgt para 2-oxoglutarato, están regulados por los sistemas de dos componentes DctBD y KgtSR, respectivamente. También establecemos que ambos sistemas reguladores interactúan mediante *cross-talk* en distintos contextos genómicos.

### 2.2. Objetivos

#### 2.2.1. Objetivo general

El objetivo de este trabajo es analizar el fenotipo y la expresión del gen *dctA* en mutantes *dctB* y *dctAdctB* de *Rhizobium tropici* CIAT899, en condiciones de vida libre. Además, pretendemos analizar el fenotipo de estos mutantes durante su asociación simbiótica con *P. vulgaris*.

#### 2.2.2. Objetivos específicos

- I. Construir mutantes *dctB* a partir de *R. tropici* CIAT899 y GA1 (*dctA*).
- II. Determinar el perfil de crecimiento de *R. tropici* CIAT899 y GA1 y de sus cepas mutantes *dctB* incubadas en medio definido (MM) en presencia de distintas fuentes de carbono.
- III. Analizar la expresión del promotor del gen *dctA* en los mutantes *dctB* y *dctAdctB* al ser incubados en MM en presencia de distintas fuentes de carbono.
- IV. Determinar la capacidad de los mutantes *dctB* y *dctAdctB* de nodular y promover el crecimiento vegetal de *P. vulgaris* en ensayos de plantas inoculadas.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Microorganismos y plásmidos utilizados

Los microorganismos y plásmidos utilizados en este trabajo se encuentran listados en la Tabla 1.

Tabla 1: Cepas, plásmidos, fagémidos y cósmidos utilizados y/o mencionados en este trabajo.

| Cepas y plásmidos        | Características relevantes                                                                                                                                                                                                   | Fuente                 |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| <i>Escherichia coli</i>  |                                                                                                                                                                                                                              |                        |
| <b>TOP10</b>             | F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$<br>$\Phi80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1</i><br><i>araD139</i> $\Delta(ara\ leu)$ 7697 <i>galU</i><br><i>galK rpsL</i> (Str <sup>r</sup> ) <i>endA1 nupG</i> | Invitrogen Corporation |
| <i>Rhizobium tropici</i> |                                                                                                                                                                                                                              |                        |
| <b>CIAT899</b>           | Cepa salvaje aislada de <i>Phaseolus vulgaris</i> L., NaI <sup>r</sup>                                                                                                                                                       | Graham y col., (1982)  |
| <b>GA1</b>               | CIAT899, mutante derivado por inserción de interposón y supresión parcial del gen <i>dctA::Gm<sup>r</sup></i>                                                                                                                | Batista y col., (2001) |
| <b>GA11</b>              | GA1 <i>kgtS::Tn5</i> , Gm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>                                                                                                                                                                       | Batista y col., (2009) |
| <b>GA12</b>              | GA1 <i>kgtR::Tn5</i> , Gm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>                                                                                                                                                                       | Batista y col., (2009) |
| <b>CIAT899.317</b>       | CIAT899 <i>kgtP::pHRP317</i> , Km <sup>r</sup>                                                                                                                                                                               | Batista y col., (2009) |
| <b>GA1.317</b>           | GA1 <i>kgtP::pHRP317</i> , Gm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>                                                                                                                                                                   | Batista y col., (2009) |
| <b>GA2</b>               | CIAT899 <i>dctB::pHD2.1</i> , Km <sup>r</sup> , Am <sup>r</sup>                                                                                                                                                              | Este trabajo           |
| <b>GA21</b>              | GA1 <i>dctB::pHD2.1</i> , Km <sup>r</sup> , Am <sup>r</sup>                                                                                                                                                                  | Este trabajo           |

| Plásmidos, fagémidos y cósmidos |                                                                                                                                                 |                                          |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| <b>pBluescript II SK</b>        | Fagémido y replicón ColE1, con región de M13, Amp <sup>r</sup>                                                                                  | Stratagene                               |
| <b>pSK-B</b>                    | pBluescript II SK con un fragmento de 6.0 kb <i>EcoRI</i> subclonado de pRTD1, con la región codificante de <i>R. tropici dctBD</i>             | Tesis de doctorado Silvia Batista (2002) |
| <b>pRTD1</b>                    | Cósmido derivado de pSUP205, de la biblioteca genómica de CIAT899, con los genes <i>dct</i> de <i>R. tropici</i> .                              | Batista y col., (2001)                   |
| <b>pCR2.1-TOPO</b>              | Origen pUC y f1, con <i>lacZ</i> como gen reportero o testigo, Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>                                               | Invitrogen Corporation                   |
| <b>pMB220</b>                   | Cósmido IncP, con <i>lacZ</i> como gen reportero o testigo                                                                                      | Spaink y col., (1987)                    |
| <b>pRU103</b>                   | Derivado de pMB220 con región intergénica <i>dctA-dctB</i> de <i>R. leguminosarum</i> 0.9 kb <i>EcoRI</i> , <i>dctA::lacZ</i> , Tc <sup>r</sup> | Raid y Poole (1998)                      |
| <b>pSB13</b>                    | Derivado de pMB220 con región intergénica <i>kgtP-kgtS</i> de <i>R. tropici</i> 1.5 <i>KpnI PstI</i>                                            | Batista y col., (2009)                   |
| <b>pAB2001</b>                  | Derivado de pUC6S con un interposón Gm <sup>r</sup> <i>lacZ</i> como gen testigo para identificar y analizar promotores, Amp <sup>r</sup>       | Becker y col., (1995)                    |
| <b>pHD2.1</b>                   | Derivado de pCR2.1-TOPO contiene un fragmento de PCR de la región interna de la secuencia codificante de <i>dctB</i>                            | Este trabajo                             |

### 3.2. Medios y condiciones de cultivo bacteriano

Las cepas de *R. tropici* se cultivaron a 30°C en medio de cultivo líquido con agitación orbital a 220 r.p.m. o en medio sólido con agar a una concentración final de 18 g/l. *R. tropici* se cultivó en medio rico TY (Apéndice 1) y para el análisis del perfil de crecimiento y actividad  $\beta$ -galactosidasa se cultivó en medio definido (MM) (Apéndice 1). Los nutrientes carbonados y nitrogenados se agregaron a una concentración final de 20 mM.

*Escherichia coli* se cultivó a 30°C en medio de cultivo líquido Luria-Bertoni (LB, ver Apéndice 1) con agitación orbital a 220 r.p.m. o en medio sólido con agar a una concentración final de 18 g/l (Miller, 1972). Para el mantenimiento de la colección de cepas, de las bacterias crecidas en un caldo rico con antibiótico se tomó una alícuota y se les agregó glicerol a una concentración final del 20%. Estas suspensiones se almacenaron en tubos a -80°C como fuente de respaldo por períodos prolongados. Los inóculos utilizados en todos los ensayos fueron obtenidos a partir de bacterias cultivadas en placas de petri con medio rico sólido en presencia de antibióticos. Estas placas se conservaron a 5°C durante un máximo de 30 días.

La estimación del crecimiento bacteriano se efectuó mediante medidas de densidad óptica. Para la determinación del perfil de crecimiento, se efectuaron medidas a 620nm un colorímetro Erma Modelo AE22. Las medidas de crecimiento para determinar actividad  $\beta$ -galactosidasa se efectuaron a 600nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV1800. Las bacterias se cultivaron en medio TY durante 24 horas en presencia de antibióticos. Las suspensiones obtenidas se centrifugaron a 6000 r.p.m. (rotor número 12154 de una Centrífuga Sigma 3K30) y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en el mismo volumen de MM  $\text{CaCl}_2$  1 mM sin fuente carbonada ni nitrogenada y esta suspensión se utilizó como inóculo para los ensayos de crecimiento y determinación de actividad  $\beta$ -galactosidasa. Las bacterias fueron incubadas en un agitador orbital a 220 r.p.m. con 5 ml de MM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20 mM y una única fuente de carbono, ensayándose cada condición por triplicado. Se agregó un volumen de inóculo de modo que la  $\text{D.O.}_{620\text{nm}}$  inicial fuera de aproximadamente 0.05. Los valores incluidos corresponden al promedio de 6 medidas

determinadas a partir de tres ensayos réplica.

### 3.3. Antibióticos e indicadores

Los antibióticos se agregaron en las siguientes concentraciones finales: sal sódica de ácido nalidíxico (Nal), 50 mg/l; kanamicina (Km), 50 mg/l para cultivar rizobio y 30 mg/l para cultivar *E. coli*; sulfato de gentamicina (Gm), 50 mg/l en el caso de rizobio y 10 mg/l en *E. coli*; ampicilina (Amp), 50 mg/l y tetraciclina (Tc), 10 mg/l.

Los ensayos en medio sólido para la visualización de la actividad de la enzima testigo  $\beta$ -galactosidasa se desarrolló por incorporación de: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactopiranosido (X-gal), 20 mg/l.

### 3.4. Ensayos de actividad enzimática

La actividad  $\beta$ -galactosidasa fue determinada por el método de Miller (1972), con las modificaciones descritas por Poole y col. (1994). Para el análisis de expresión del gen *dctA* usamos el cósmido pRU103 (Reid y Poole, 1998). Este cósmido es un derivado del vector de amplio espectro pMB220 con la región intergénica de los genes *dctAB* de *R. leguminosarum* clonada en el sitio *EcoRI*. La construcción de pRU103 permitió generar la fusión génica del promotor del gen *dctA* (*pdctA*) con el gen reportero *lacZ*. Se efectuaron ensayos control de *R. tropici* CIAT899, GA1 y de sus respectivos mutantes *dctB* con el cósmido pMB220 sin inserto, con el fin de determinar la actividad basal de la enzima testigo. *R. tropici* CIAT899, GA1 y sus respectivos mutantes *dctB* fueron sembradas en 5 ml de MM por triplicado, en presencia de cada una de las siguientes fuentes carbonadas: glucosa y las sales sódicas de fumarato, malato, succinato y 2-oxoglutarato. Para analizar el perfil de crecimiento y la actividad  $\beta$ -galactosidasa fueron realizadas medidas de densidad óptica (D.O.) a 600nm y 420nm respectivamente.

Para calcular la actividad específica (AE) de  $\beta$ -galactosidasa se utilizó la ecuación de Lambert-Beer. Ésta relaciona la absorbancia con la concentración del soluto analizado mediante una ecuación: **A** es la absorbancia de la muestra, **a** es el coeficiente de extinción molar, **b** la distancia que recorre el haz de luz a través de la cubeta y **C** la concentración de soluto.

$$A = C \cdot b \cdot a$$

Se calculó la AE como:

$$\begin{aligned} & \text{AE (n° moles de o-nitrofenilgalactósido hidrolizado. min}^{-1} \cdot (\text{mg de proteína})^{-1}) \\ &= A_{420\text{nm}} \cdot V_{\text{reacc}} \cdot (1.212 \text{ ml}) \cdot 10^6 \text{ (factor transf. nmol)} / A_{600\text{nm}} \cdot 0.022 \text{ (factor conv. mg prot.} \\ & \quad \text{ml}^{-1}) \cdot V_{\text{cultivo}} (0.35 \text{ ml}) \cdot T \text{ (tiempo en min.)} \cdot \text{Coef ext. mM (4017.821)} \end{aligned}$$

### 3.5. Técnicas moleculares

#### 3.5.1. Purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina y fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa 1%

El aislamiento de plásmidos, fagémidos y cósmidos se efectuó por el método de lisis alcalina de acuerdo al protocolo descrito por Ausubel y col. (1992) o empleando el sistema GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit Fermentas (Maryland, USA). Para el aislamiento de los plásmidos se partió de 5 ml de un cultivo de *E. coli* en medio LB, incubado a 30°C con agitación orbital a 220 r.p.m. durante 18 horas.

Las electroforesis de ADN se efectuaron en geles de agarosa al 1% en TAE 1x, de acuerdo a la técnica descrita por Ausubel y col. (1992). Las bandas de ADN se purificaron a partir de geles de agarosa empleando el DNA Extraction Kit Fermentas (Maryland, USA).

#### 3.5.2. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las digestiones con enzimas de restricción se efectuaron según las especificaciones de la empresa productora de enzimas (Invitrogen, USA). Se utilizaron las siguientes enzimas: *Sall*, *BglII*, *XhoI*, *HindIII* y *KpnI*.

#### 3.5.3. Análisis de la secuencia parcial del gen *dctB*

En primer lugar se analizó la secuencia de parte de un fragmento nucleotídico conteniendo los genes *dctBD* de *R. tropici* CIAT899 clonado en el sitio *EcoRI* del fagémido pBluescriptII SK (pSK-B), obtenido previamente en el Laboratorio de

Bioquímica del IIBCE (Batista y col., 2009). La reacción de secuenciación se realizó en la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo (Uruguay), empleando un secuenciador automático de 4 capilares, ABI3130 (Applied Biosystems, USA). Para la reacción de secuenciación se utilizaron los oligonucleótidos T7 (5'TAATACGACTCACTATAGGG3') o T3 (5'AATTAACCCTCACTAAAGGG3'), cuyos sitios de unión al templado están ubicados a ambos lados del sitio *EcoRI* del vector pBluescript-II SK. La secuencia de nucleótidos obtenida y la secuencia aminoacídica deducida se compararon contra la base de datos del Genbank mediante los programas blastn y blastx, respectivamente. Este análisis confirmó que la secuencia de 690pb obtenida a partir del cebador T7 correspondía a la región inicial del gen *dctB*, que codifica para la proteína DctB (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul y col., 1997). En esta secuencia fue identificado un posible codón de inicio (ATG) en la posición 170 (ver Figura 9). Posteriormente, la secuencia del fragmento de *dctB* fue empleada para el diseño de oligonucleótidos dirigidos a amplificar un fragmento interno de la región codificante del potencial gen *dctB*, que no incluyera el posible ATG de inicio. Los oligonucleótidos fueron diseñados utilizando el programa Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft International), y fueron sintetizados por la empresa SBS (SBS Manufacturers China). Dichos oligonucleótidos de secuencia 5' GCCAACGAACGATTTCTAACGC 3' (BDSK1) y 5' TCGCACCTGCTGATCGTCG 3' (BDSK2) corresponden a las secuencias nucleotídicas ubicadas en las posiciones 31 y 269 respectivamente, con relación al primer nucleótido de la secuencia codificante deducida que generaría la proteína sensor DctB (Fig. 9).

#### 3.5.4. Amplificación del gen *dctB*

La región intragénica del gen *dctB* fue obtenida mediante PCR utilizando los oligonucleótidos cebadores anteriormente mencionados. Cada reacción se llevó a cabo con 2.5 µl de buffer de PCR 10x conteniendo MgCl<sub>2</sub> 20 mM, 2 µl de dNTPs 2.5 µM, 0.2 µl de enzima Taq ADN polimerasa 5 U/µl (Invitrogen), 1 µl de cada cebador (oligonucleótidos BDSK1 y BDSK2) 20 µM y agua bidestilada c. s. p. 25 µl. Se utilizó como molde de ADN, 1 µl del plásmido pSK-B, 1 µl del gen *dctB* clonado en los sitios *EcoRI* del plásmido pCR2.1-TOPO (pHD2.1) extraídos por lisis alcalina (o agua en el caso del control negativo). Se empleó un termociclador Px2 Thermal Cycler (USA) con

el siguiente programa: una etapa de desnaturalización inicial durante 5 min a 94°C, seguido por 5 ciclos que consistieron en: 30 s a 94°C, 30 s a 60.5°C y extensión por 30 s a 72°C. Luego se prosiguió con 25 ciclos de: 30 s a 94°C, 30 s a 59.5°C y 30 s a 72°C. El programa finalizó con una extensión de 4 min a 72°C.

#### 3.5.5. Ligación de productos de PCR

Para clonar los productos amplificados aprovechamos la capacidad de la Taq ADN polimerasa de adicionar residuos de adenina (A) al extremo 3' de los productos de PCR (debido a la incorporación preferencial de dATP) dando lugar a extremos de simple cadena con la capacidad de aparearse con secuencias monohebra con residuos de timina (T). En este caso, fue utilizado el vector pCR2.1-TOPO, el cual cuenta con extremos monohebra con residuos de T en el extremo 3'. Este vector forma parte del kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen, USA). Para el clonado del producto de PCR se procedió de acuerdo con el protocolo descrito en el manual del kit (Invitrogen, USA).

```

5' GAATTNANCAGNCCTCCGACTGTTTCATCATCCTTTNCNNNTGGCCGTGCCAAATGCGCG
| 60
3' CTTAANTNGTCNGGAGGCTGACAAAGTAGTAGGAAANGNNNACCGGCACGGTTTACGCGC
|
5' CCATGATTTTAAACACATTGCTTTTATTGAGTTTGTATTTCGGGCGCGGATCGAAGGTCGT
| 120
3' GGTACTAAAATTGTGTAACGAAAATAACTCAAACTAAAGGCCGCGCCTAGCTTCCAGCA
|
5' CGGCCTGTGCGACTATCCGCACAGATCGAATTGCGGTGCGCGCGAAATCATGCACAATAC
| 180
3' GCCGGACACGCTGATAGGCGTGTCTAGCTTAACGCCACGCGCGCTTTAGTACGTGTTATG
|
5' GGCAATGCTGCAGCGCCCGGCCAACGAACGATTTCTAACGCAGAGCAACTGGGCCGGCG
| 240
3' CCGTTACGACGTCGCGGGCCGGTTGCTTGCTAAAGATTGCGGTCTCGTTGACCCGGCCGC
|
5' CTCCCGCCGGGTCTGGCTCGTGTGCGTTTCTAAGTGC GGCTGTCATTGCGGCTGGACT
| 300
3' GAGGGCGGCCAGACCGAGCACAAACGCAAAGATTACGCCGACAGTAACGCCGACCTGA
|
5' TTATGGCGCGAATTTCTATGGTCGGCTCTCGGCAATAGAAACGCTGCAGAGGCAGGGGCA
| 360
3' AATACCGCGCTTAAAGATACCAGCCGAGAGCGTTATCTTTGCGACGTCTCCGTCCCCGT
|
5' CACGGATGCGAACCTCAAGGTTGCCCTGCTGCGCGCAGTCCTCGAACTGTCCGCGCGCCC
| 420
3' GTGCCTACGCTTGAGATTCCAACGGGACGACGCGCGTCAGGAGCTTGACAGGCGCGCGGG
|
5' TGCCGCTCTTGCTGGCCGACGATCAGCAGGTGCGAGATGCGCTCGCCGAGAAGCACATNG
| 480
3' ACGGCGAGAACGACCGGCTGCTAGTCGTCCACGCTCTACGCGAGCGGCTCTTCGTGTANC
|
5' ACGATGTTGTTGCCCTGGACCGCAAGNNCGAAAGTCNCGTCTCGGGCACCAGCGCATCCG
| 540
3' TGCTACAACAACGGGACCTGGCGTTTCNNGCTTTTCAGNGCAGAGCCCCTGGTCGCGTAGGC
|
5' TCCTTTACGTCACCGGCAAGGACGGCGTCNCCATGGGCCTCCAGCAACTGGCGCGAGCCC
| 600
3' AGGAAATGCAGTGGCCGTTCTTGCCGCAGNGGTACCGGAGGTGCTTGACCGCGCTCGGG
|
5' TTGANTTTNCGTCCGGCAATGACTATTTCCNTCCCNCAATTATTTCCCGCAAAGNCCAAT
| 660
3' AACTNAAANGCAGGCCGTTACTGATAAAGGNAGGGNGTTAATAAAGGGCGTTTCNGGTTA
|
5' GGGAAAACNGGNANCCGCCCNANCANTT
|
3' CCCTTTTGNCCNNTNGGCGGGNTNGTNA

```

Figura 9: Secuencia nucleotídica parcial del gen *dctB* ligada al vector pSK-B. En el recuadro amarillo se encuentra el probable codón de inicio de la secuencia codificante. Los recuadros verdes señalan las secuencias de unión a los cebadores BDSK1 y BDSK2 utilizados para amplificar por PCR una región interna al gen *dctB* (ver Materiales y métodos). Secuencia de los cebadores: BDSK1; 5' GCCAACGAACGATTTCTAACGC; BDSK2: 5' TCGCACCTGCTGATCGTCG.

### 3.6. Técnicas genéticas

#### 3.6.1. Transformación bacteriana por choque térmico de *E. coli*

Alícuotas de 100 µl de células de *E. coli* TOP10 químicamente competentes (Ausubel, 1992) fueron incubadas durante 20 minutos en baño de hielo con 10 µl del producto de clonado. La mezcla fue sometida a un choque térmico durante 2 minutos a 42°C, seguido de una incubación en hielo por 10 minutos. Posteriormente, la suspensión de células fue incubada en 1 ml de medio LB a 30°C durante 1 hora en un agitador orbital a 220 r.p.m. Alícuotas de esta suspensión fueron posteriormente aplicadas por “rastrillado” en placas de petri con medio LB sólido en presencia de Km y X-Gal.

#### 3.6.2. Transformación bacteriana por choque eléctrico de *R. tropici*

El clon conteniendo el vector plasmídico pCR2.1-TOPO y el fragmento del gen *dctB* amplificado mediante PCR se transfirió a cepas de *R. tropici* por electroporación con un MicroPulser TM (Bio Rad, CA), preprogramado para transformar células de *Agrobacterium tumefaciens*. Para la electroporación, la suspensión de células electrocompetentes (100 µl) (Ausubel, 1992) fue mezclada con 5 µl de la mezcla de clonado mencionada inicialmente. Luego, se colocó la suspensión en cubas de electroporación estériles (2 mm) para ser sometida a un choque eléctrico en el electroporador. Seguidamente, 1 ml de caldo TY fue adicionado a la mezcla y la suspensión de células se transfirió a tubos de microfuga estériles. Estos tubos se incubaron por 1 hora a 30°C en un agitador orbital a 220 r.p.m. Posteriormente, se extendieron alícuotas de 100-200 µl de esta suspensión por rastrillado en placas de petri con medio TY sólido en presencia de los antibióticos necesarios para seleccionar las cepas de *R. tropici* usadas como huésped y el vector transferido (ver Tabla 1).

### 3.7. Técnicas bioquímicas

#### 3.7.1. Ensayos de plantas

Las semillas de *P. vulgaris* se esterilizaron superficialmente por inmersiones sucesivas en etanol 95% durante 1 min, en HgCl<sub>2</sub> 0.2% en HCl 60 mM por 5 min y 6 lavados en agua destilada estéril. Las semillas se incubaron en placas de petri estériles que contenían agua agar 0.8% a 30°C durante 24 a 48 horas para que germinaran. Por

otro lado, los rizobios a ensayar se cultivaron en 5 ml de medio TY líquido durante 24 horas en presencia de antibióticos. Los cultivos se centrifugaron a 6000 r.p.m. en el rotor número 12154 de una Centrífuga Sigma 3K30, se lavaron las células en medio definido (MM) sin fuente nitrogenada y finalmente se resuspendieron en MM para alcanzar una  $D.O._{620nm} = 1$ . Las semillas pregerminadas se sumergieron en la suspensión celular a 30°C en la oscuridad durante 2 horas. Luego, las semillas germinadas se colocaron en bolsas de polipropileno de 12 cm x 24 cm con papel de mimeógrafo como soporte, previamente esterilizadas en autoclave. Estos papeles fueron preparados con doblez y dos orificios para que se pudiesen colocar dos semillas por bolsa enfrentando las raíces a los orificios correspondientes. Se utilizó solución nutritiva Jensen (Vincent, 1970) como medio de riego semanal y agua estéril para los riegos diarios en caso de ser necesario. Las semillas inoculadas se transfirieron a las bolsas y se incubaron durante 30 días en cuartos especialmente acondicionados a 24°C con fotoperiodos de 12 horas. En todos los casos se determinó el peso seco de la parte aérea de la planta de acuerdo a la técnica descrita por Somasegaran y Hoben (1994).

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1. Ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa del *pdctA* en las cepas CIAT899 y GA1 (*dctA*) de *R. tropici*

El cósmido pRU103 fue diseñado originalmente para analizar la expresión del gen *dctA*, proveniente de *R. leguminosarum*, mediante la fusión de su promotor al gen *lacZ* (Reid y Poole, 1998). En nuestro caso utilizamos pRU103 para analizar la expresión del gen *dctA* en *R. tropici*. Este gen, más allá de su origen heterólogo, está bastante conservado en el genoma de los rizobios clásicamente estudiados. Es por ello que lo incluimos y obtuvimos resultados satisfactorios en los ensayos de expresión en presencia del sistema de dos componentes DctBD, propio de *R. tropici*. Las cepas de rizobio con el plásmido pRU103 se sometieron a diferentes condiciones de crecimiento. El cósmido pMB220 (Tabla 1) se utilizó como vector control. Las gráficas de la Figura 10 muestran la actividad del *pdctA* en GA1 (*dctA*) y CIAT899 incubadas en MM CaCl<sub>2</sub> 1 mM, NH<sub>4</sub>Cl 20 mM durante 24 horas, en presencia de glucosa o las sales sódicas de succinato, 2-oxoglutarato, malato o fumarato como únicas fuentes de carbono. En CIAT899, la expresión de *pdctA* fue notoriamente elevada en presencia de malato y fumarato. Por el contrario, en glucosa, succinato o 2-oxoglutarato, los niveles de actividad fueron levemente superiores a los obtenidos en la cepa control CIAT899(pMB220). En GA1, *dctA* mostró niveles de actividad muy similares para todas las fuentes de carbono utilizadas y superiores a los obtenidos en la cepa control GA1(pMB220).

La enzima testigo  $\beta$ -galactosidasa en CIAT899(pMB220) presentó una actividad basal de 90.21 nmoles.min<sup>-1</sup>.(mg prot.)<sup>-1</sup>, y en GA1(pMB220) de 39.91 nmoles.min<sup>-1</sup>.(mg prot.)<sup>-1</sup>. En las gráficas se muestra la desviación estándar de los valores obtenidos en cada ensayo.

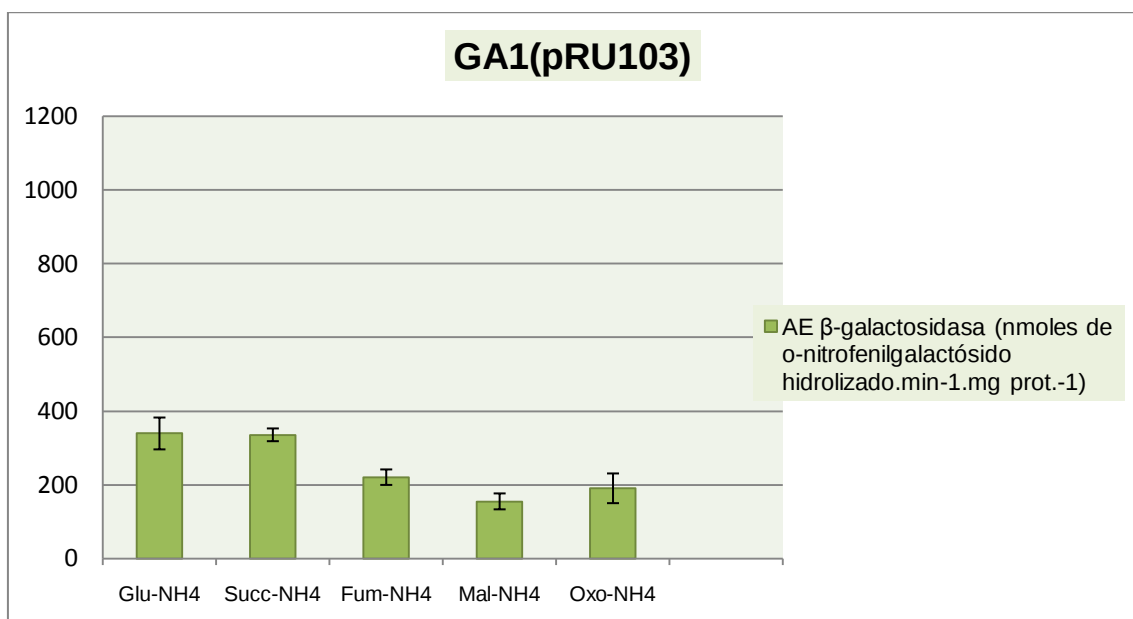
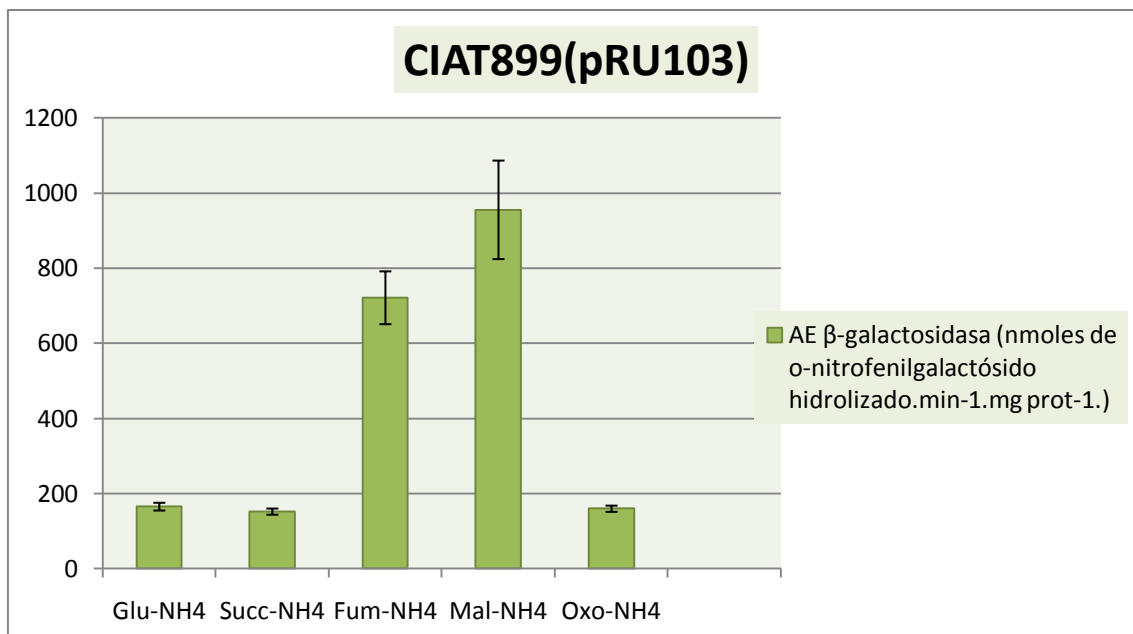


Figura 10: Actividad de enzima testigo β-galactosidasa en *R. tropici* CIAT899 y *R. tropici* GA1 (*dctA::Gm<sup>r</sup>*) con el plásmido pRU103 (*pdctA::lacZ*). CIAT899(pMB220): 90.21 nmoles.min<sup>-1</sup>.(mg prot.)<sup>-1</sup>±11.12. GA1(pMB220): 39.91 nmoles.min<sup>-1</sup>.(mg prot.)<sup>-1</sup> ± 4.93. Abreviaciones: Glu, glucosa; Succ, succinato; Fum, fumarato; Mal, malato y Oxo, 2-oxoglutarato. NH<sub>4</sub>: fuente nitrogenada, NH<sub>4</sub>Cl. Las células fueron incubadas en TY durante 24 horas, y se tomó una alícuota como inóculo para los ensayos de actividad β-galactosidasa de acuerdo a lo descrito en Materiales y métodos. Se sembró en tubos por triplicado para cada fuente de carbono.

Ambas cepas de *R. tropici* (CIAT899 y GA1) se incubaron en MM CaCl<sub>2</sub> 1 mM, NH<sub>4</sub>Cl

20 mM, con las fuentes carbonadas mencionadas en cada caso.

#### 4.2. Construcción de mutantes en el gen *dctB*

Se llevaron a cabo dos estrategias de construcción de mutantes en el gen que codifica para la proteína sensor DctB en las cepas CIAT899 y GA1. En el marco de la primer estrategia, la región *dctBD* subclonada en el vector pSK-B (Tabla 1) fue analizada parcialmente por medio de la construcción de un pequeño mapa de restricción. El conocimiento de algunos sitios de restricción permite identificar posibles puntos diana que podrían utilizarse para la inserción del interposón (con gen que confiere resistencia a Gm y gen *lacZ*) proveniente del plásmido pAB2001 (Tabla 1). El interposón aislado por medio de la digestión con enzimas específicas sería posteriormente inserto en el ORF *dctBD*, previamente digerido con las mismas enzimas u otras que generen extremos cohesivos. Para dicho propósito se realizaron digestiones simples y dobles de pSK-B con distintas enzimas de restricción (ver Materiales y Métodos). Sin embargo, no fueron hallados sitios factibles para una inserción exitosa del interposón, optando por diseñar una segunda estrategia para la construcción de los mutantes.

En la segunda estrategia, fueron contruidos mutantes de CIAT899 y GA1 del gen *dctB* empleando un plásmido suicida conteniendo un fragmento de ADN correspondiente a una región interna del ORF del gen *dctB*. Para obtener el mutante *dctB*, se promovió la inserción del plásmido suicida mediante recombinación entre el cromosoma de CIAT899 (o GA1) y el fragmento interno del gen *dctB*.

##### 4.2.1. Procedimiento

Un fragmento correspondiente a una región interna de *dctB* (Fig. 11) se aisló mediante PCR a partir de pSK-B, utilizando los cebadores BDSK-1 y BDSK-2 diseñados como se detalló previamente (ver Materiales y métodos). La secuencia parcial del gen *dctB* obtenida correspondía a 257pb de la región codificante de dicho gen. El producto de PCR y el plásmido pCR2.1-TOPO (Fig. 12) se mezclaron para promover el clonado, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción se usó para transformar, por shock térmico, células de *E. coli* TOP10 químicamente

competentes. Los clones conteniendo el producto deseado deberían ser capaces de crecer formando colonias blancas, al ser sembrados en placas con medio LB Km X-Gal. Mediante lisis alcalina se obtuvieron las preparaciones plasmídicas provenientes de cuatro colonias blancas y una azul (como control negativo) de las *E. coli* TOP10 transformadas. Luego, una alícuota de las preparaciones plasmídicas se digirió con *EcoRI* y se analizó por electroforesis. En el caso de las preparaciones plasmídicas obtenidas de las colonias blancas, en la electroforesis se visualizó una banda del tamaño correspondiente al fragmento de *dctB* clonado y una del tamaño del plásmido. Sin embargo, en el caso de las preparaciones plasmídicas obtenidas de la colonia azul, en la electroforesis se visualizó solo una banda correspondiente al tamaño del plásmido. Por lo tanto, se confirmó la presencia del producto de clonación en las colonias blancas. Luego, los plásmidos con el fragmento de *dctB* clonado (pHD2.1) de las colonias blancas sin digerir se transfirieron por electroporación a las cepas CIAT899 y GA1. El plásmido pHD2.1 contiene determinantes de resistencia a ampicilina y kanamicina, y no es replicable en rizobio (ver Tabla 1). Su persistencia en rizobios se lograría mediante la formación de un cointegrado. Se realizó un esquema de los cointegrados a obtener y se dedujo la formación de dos posibles, los cuales diferirían en la síntesis o no de DctB, dependiendo del sentido de inserción del fragmento *dctB* (Fig. 13).

En los cointegrados, el inserto de pHD2.1 correspondiente a una región interna e inicial del gen *dctB* se duplica, localizándose una copia en cada extremo del plásmido lineal inserto en el cromosoma del rizobio. En uno de los casos, uno de los extremos del plásmido contendría así una copia del fragmento *dctB* (sentido 5'→3') precedido por un codón de inicio ATG y el promotor *plac*, respectivamente y seguido del resto del gen *dctB* genómico (ver Figura 13). Mediante el análisis de la secuencia del fragmento de *dctB* se comprobó que si este fragmento está clonado en el mismo sentido del *plac*, no se generan cambios en el marco de lectura y es posible transcribir el ORF *dctB* modificado sólo en los primeros aminoácidos (Fig. 13, A). Por lo tanto, el cointegrado resultante sería capaz de codificar para una proteína de fusión sensor funcional, debido a la intervención del ATG del vector y del promotor fuerte, *plac*. Por el contrario, se comprobó que si el sentido del fragmento *dctB* (sentido 5'→3') diverge con respecto al sentido del *plac* (Fig. 13, B), se imposibilitaría la síntesis de una proteína DctB funcional a pesar de la presencia del codón ATG y del *plac*.

Previamente a la electroporación y con el fin de descartar la formación del cointegrado indeseado, se determinó el sentido del inserto con respecto al plásmido mediante PCR de varias muestras de pHD2.1. Cada una de las preparaciones plasmídicas se sometió a PCR utilizando los siguientes pares de cebadores en reacciones independientes: M13F/BDSK1 y M13F/BDSK2 (ver Figura 14). El sentido del inserto determinó que pares de cebadores generaban un producto de amplificación de tamaño esperado. En aquellas muestras donde hubo amplificación con los cebadores M13F y BDSK2, y no con los cebadores M13F y BDSK1, se confirmó que el sentido de síntesis del inserto *dctB* (sentido 5'→3') era divergente al de *plac*. Por lo tanto, fueron seleccionadas para electroporar CIAT899 y GA1.

Para identificar a los mutantes se utilizó un criterio de selección por fenotipo de resistencia a antibióticos. La cepa mutante derivada de CIAT899 capaz de crecer en medio TY sólido en presencia de Nal Km, se denominó GA2. La cepa mutante derivada de GA1 capaz de crecer en medio TY sólido en presencia de Nal Km Gm, se denominó GA21. Se seleccionó un clon derivado de cada una para los estudios posteriores.

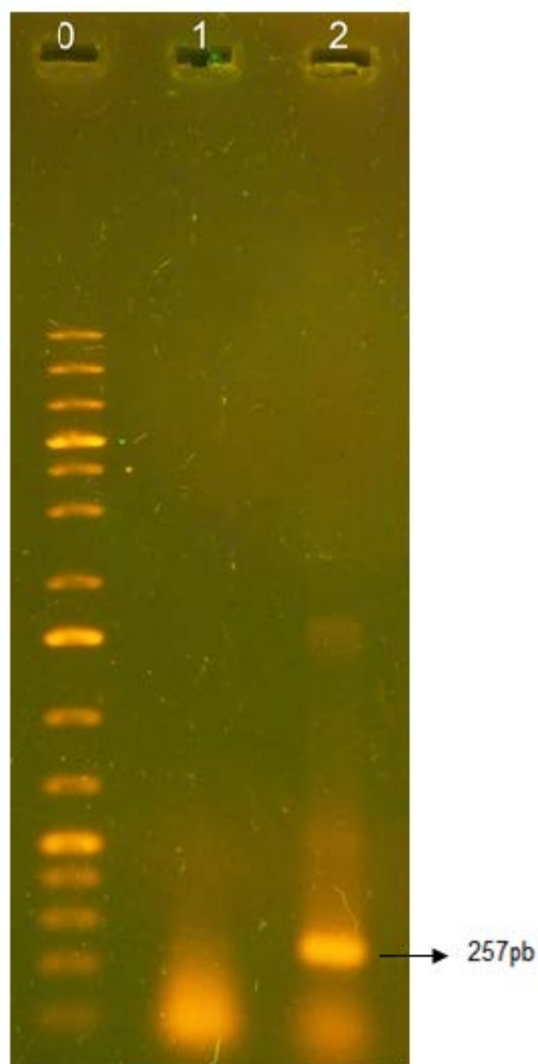


Figura 11: Electroforesis del fragmento interno del gen *dctB* obtenido por una reacción de PCR generada a partir del vector pSK-B utilizando los cebadores BDSK1 y BDSK2. Carril 0: marcador molecular Ladder Plus 1Kb (Fermentas, USA). Carril 1: control negativo. Carril 2: producto de PCR de 257pb (ver Materiales y métodos).

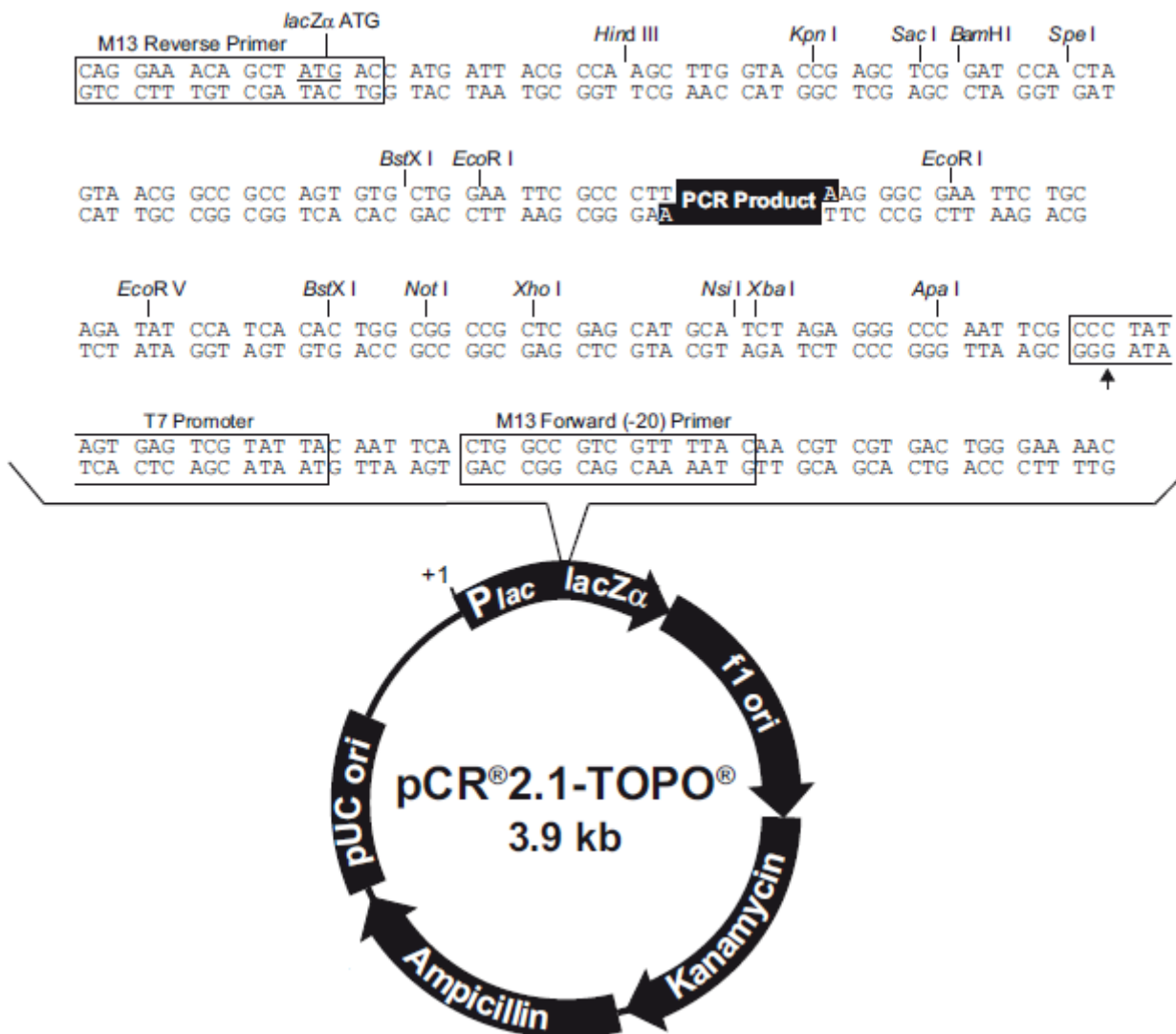


Figura 12: Vector pCR2.1-TOPO. Se indica el sitio de clonado del producto de PCR (fragmento *dctB*), los sitios de restricción y de unión de los cebadores M13R y M13F. Figura extraída del manual del kit TOPO TA Cloning (Invitrogen, USA).

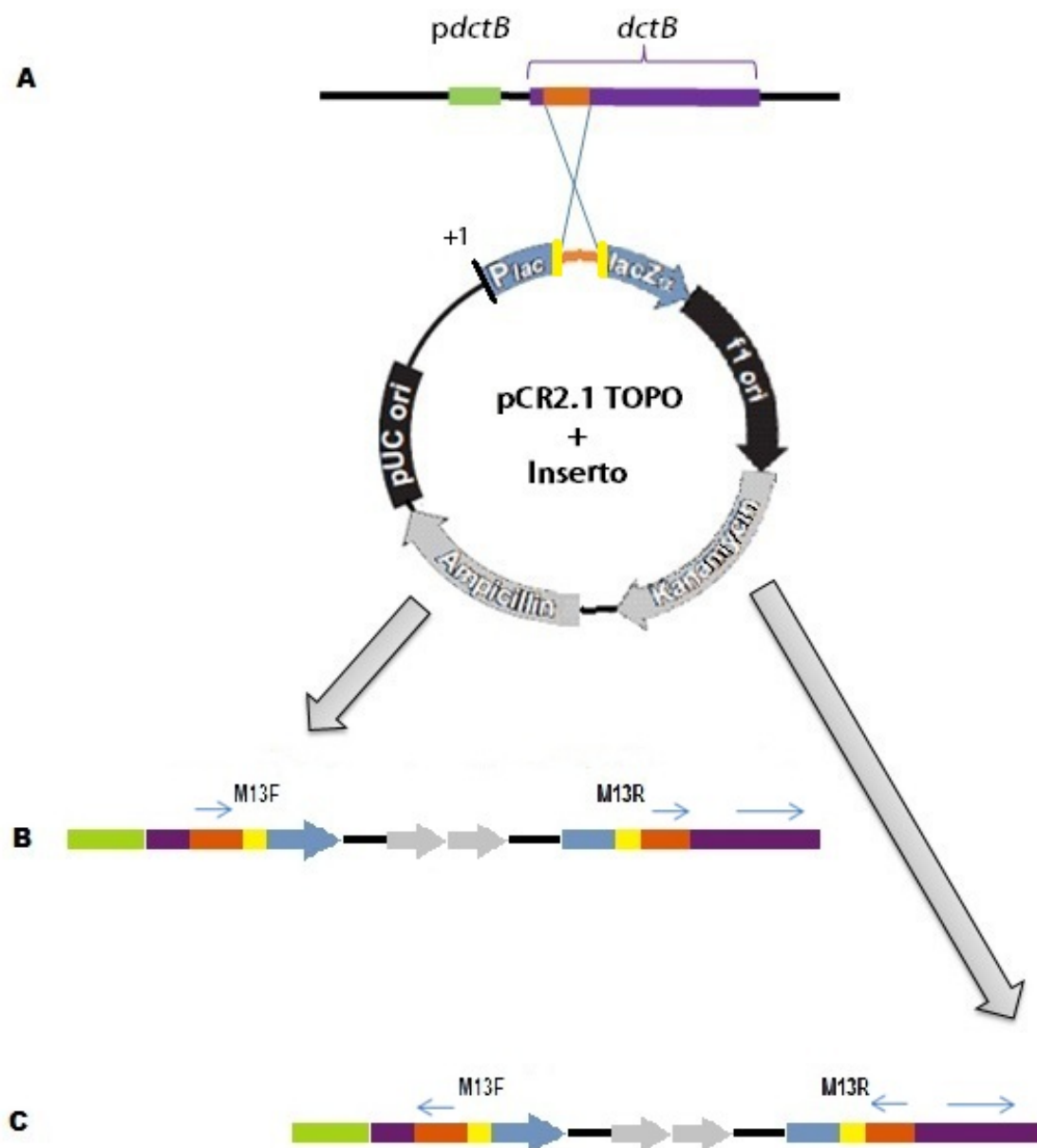


Figura 13: Esquema representativo de cointegrados. **A**; Gen *dctB* en el genoma de *R. tropici*, y vector pCR2.1-TOPO ligado al producto de PCR obtenido con los cebadores BDSK1 y BDSK2 a partir del gen *dctB*. Esquema de los posibles cointegrados: **B**; el sentido del promotor contenido en el vector tiene el mismo sentido que el gen *dctB* y puede sintetizarse una proteína de fusión bajo el promotor fuerte *lacZ*. **C**; el sentido del promotor *lacZ* diverge con respecto al del gen *dctB*. Las flechas celestes representan el sentido de síntesis de *dctB* y del fragmento de *dctB*. Los orígenes de replicación del vector no se representaron en los cointegrados. Está representado en color naranja la región del gen *dctB* obtenida por PCR, en lila el gen *dctB*, en verde su promotor, en amarillo se representan los sitios de unión a los cebadores M13R y M13F, y con líneas cruzadas, el evento de recombinación.

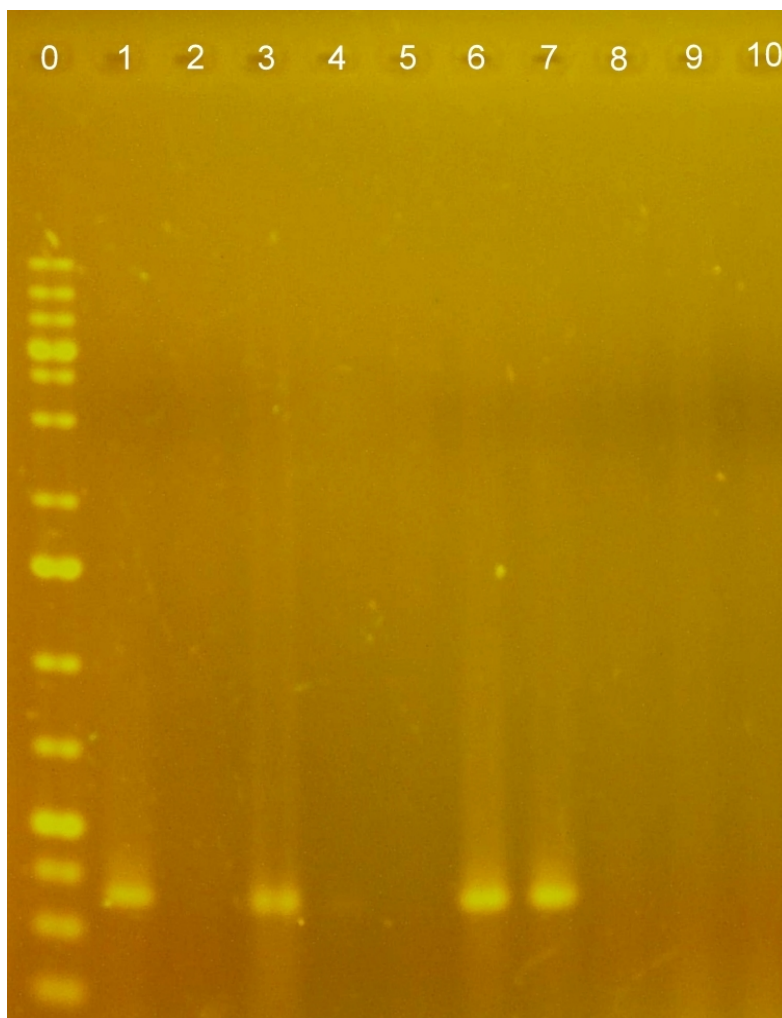


Figura 14: Electroforesis de productos de PCR. Se utilizaron los cebadores M13F/BDSK1 en los carriles pares, y los cebadores M13F/BDSK2 en los carriles impares. Carriles 0-8: se utilizó como ADN molde, plásmido purificado de cuatro clonas de *E. coli* blancas. Carriles 9: se utilizó como ADN molde, plásmido purificado de una clona de *E. coli* azul. Carril 10: control negativo sin ADN.

#### 4.3. Perfil de crecimiento de las cepas salvajes y mutantes

En las Figuras 15 y 16 se representa el perfil de crecimiento de las cepas CIAT899, GA1 (*dctA*), GA2 (*dctB*) y GA21 (*dctAdctB*) crecidas en MM con  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20 mM como fuente de nitrógeno y en presencia de glucosa o las sales sódicas de malato, succinato o fumarato como únicas fuentes de carbono, según se indique en cada caso.

La cepa CIAT899 creció en todas las fuentes de carbono utilizadas. El

crecimiento en glucosa alcanzó la mayor D.O.<sub>620nm</sub> en la medida efectuada a las 35 horas de incubación (0.480). Esta D.O. es mayor que los valores obtenidos al usar succinato, fumarato o malato como fuentes de carbono. En las primeras 10 horas de incubación, la velocidad de crecimiento fue mayor al usar glucosa o malato como fuentes de carbono. La cepa GA1 creció en glucosa y succinato pero no en malato o fumarato como fuentes de carbono. La curva de crecimiento en glucosa alcanzó valores de D.O.<sub>620nm</sub> más elevados y mostró una pendiente mayor en relación a la curva de crecimiento obtenida en presencia de succinato. De forma similar a GA1, los mutantes GA2 y GA21 obtenidos de CIAT899 y GA1 respectivamente, crecieron utilizando como únicas fuentes de carbono glucosa o succinato y alcanzaron los mismos niveles de crecimiento que GA1. Ambas cepas mutantes mostraron una muy reducida habilidad de crecer utilizando malato o fumarato como fuentes de carbono. Las curvas de crecimiento de GA2 fueron similares a las de GA1. En cambio, GA21 presentó un crecimiento más lento en succinato y glucosa.

Las cuatro cepas también fueron incubadas en MM con  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20 mM y glucosa o 2-oxoglutarato como única fuente de carbono. Todas las cepas fueron capaces de crecer al ser incubadas en estas fuentes de carbono (no se muestran los datos).

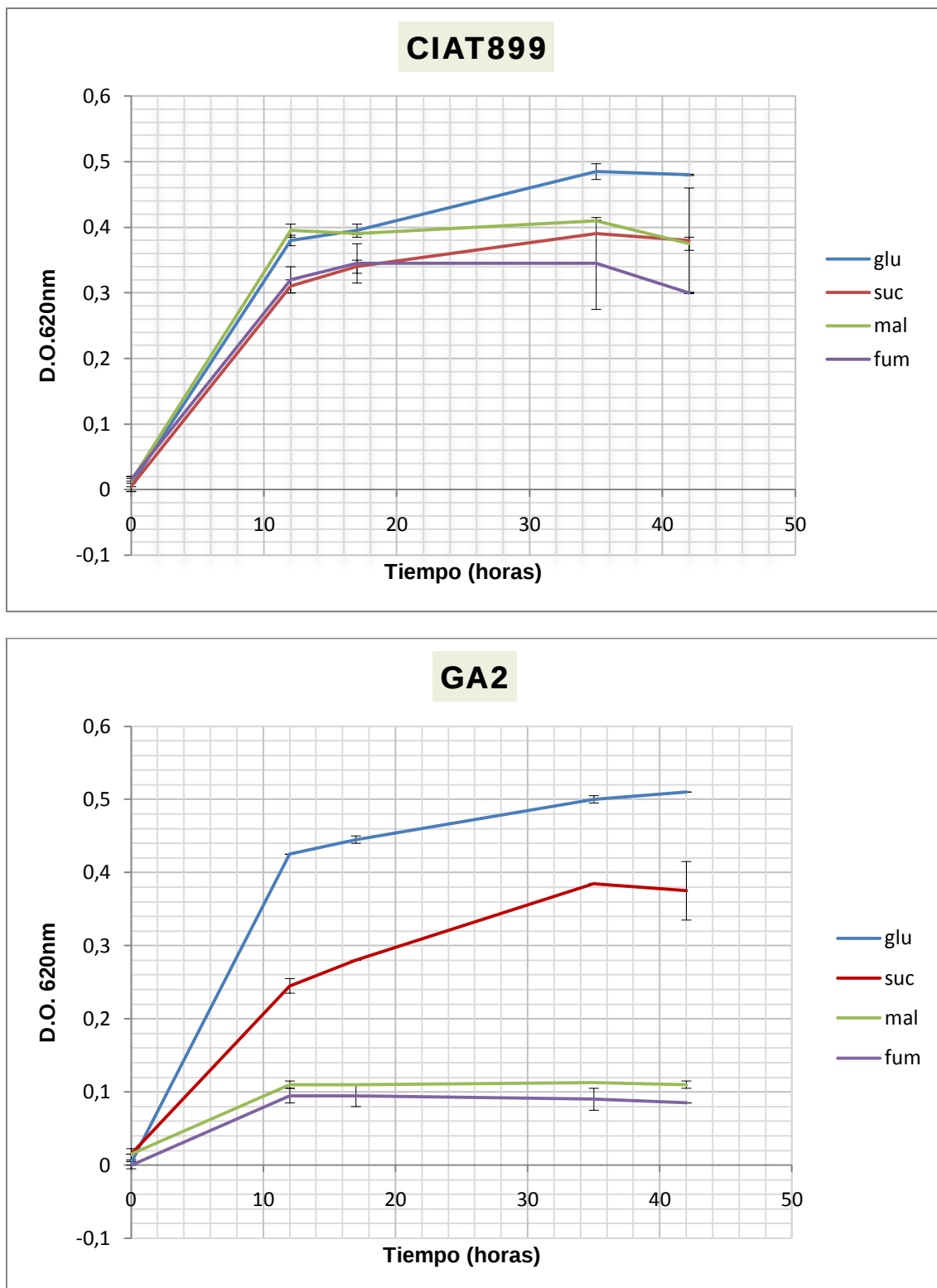


Figura 15: Perfil de crecimiento de *R. tropici* CIAT899 y su mutante *dctB* (GA2) cultivadas en MM con  $\text{CaCl}_2$  1 mM y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20 mM como fuente de nitrógeno. Las fuentes carbonadas fueron añadidas a una concentración final 20 mM. Abreviaciones: glu, glucosa; suc, succinato; mal, malato; fum, fumarato.

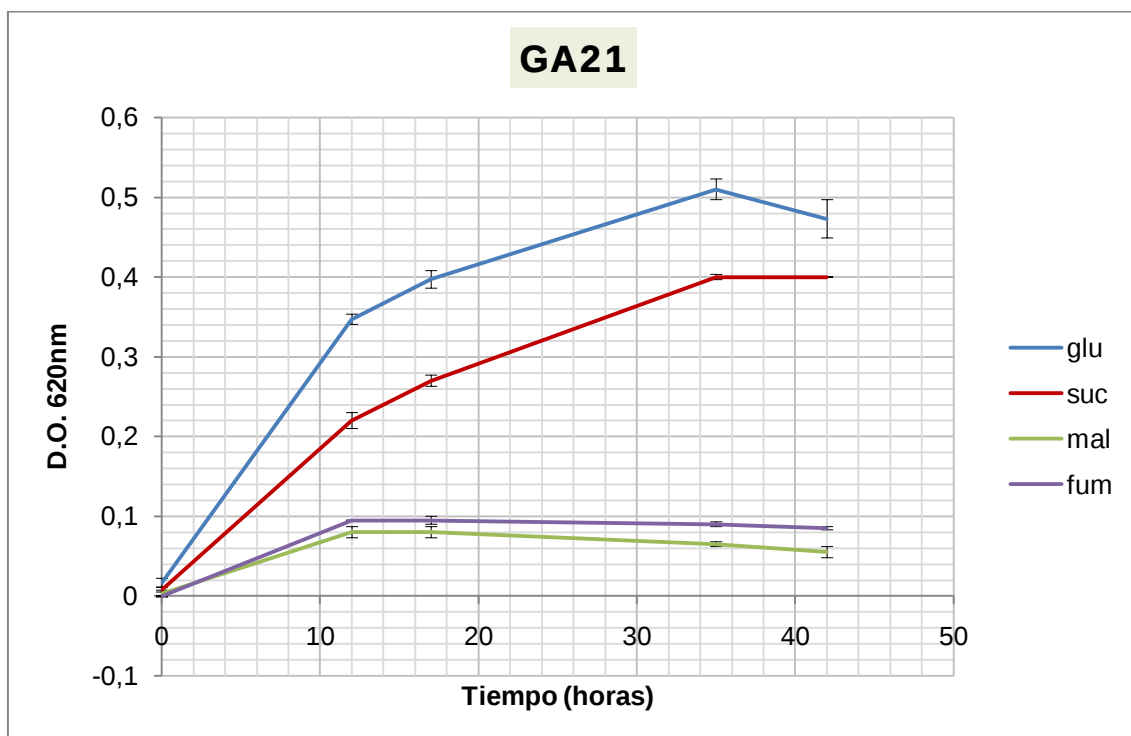
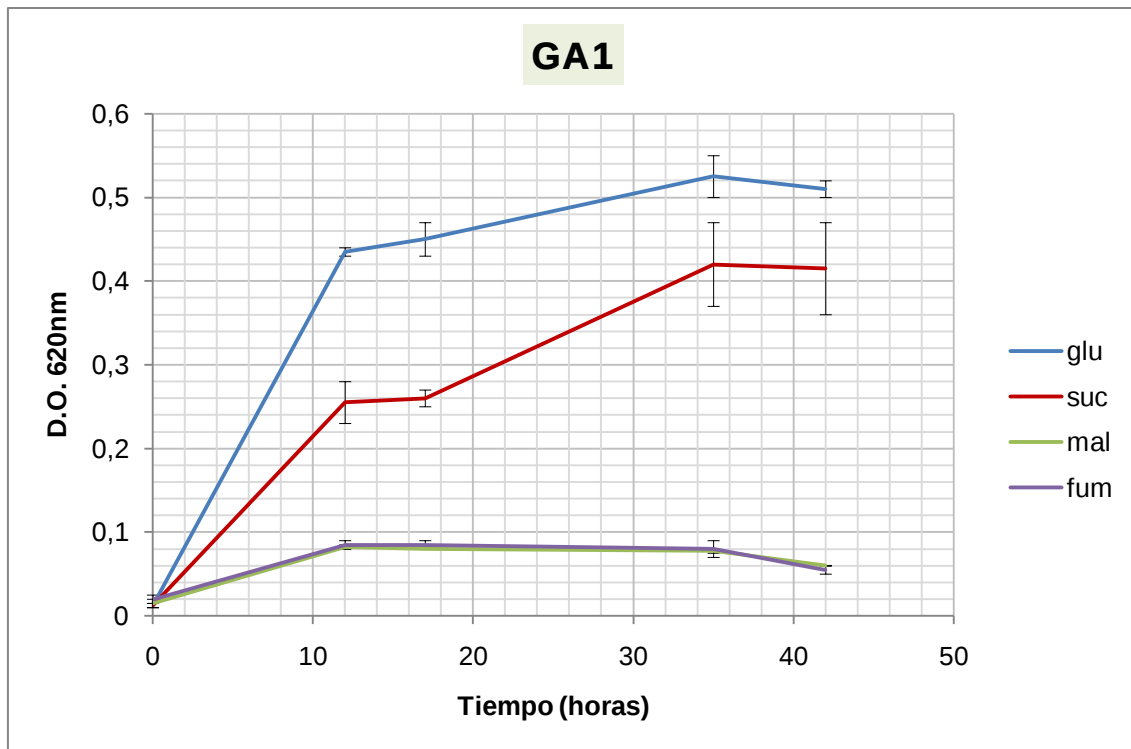


Figura 16: Perfil de crecimiento de GA1 y su mutante *dctB* (GA21) cultivadas en MM con  $\text{CaCl}_2$  1 mM y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20 mM como fuente de nitrógeno. Las fuentes carbonadas fueron añadidas a una concentración final 20 mM. Abreviaciones: glu, glucosa; suc, succinato; mal, malato; fum, fumarato.

#### 4.4. Ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa del *pdctA* en las cepas GA2 (*dctB*) y GA21 (*dctAdctB*) de *R. tropici*

En la gráfica de la Figura 17 se muestra la actividad del promotor *dctA* en los mutantes GA2 (*dctB*) y GA21 (*dctAdctB*) incubados en MM  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20 mM durante 24 horas, en presencia de glucosa o las sales sódicas de succinato, 2-oxoglutarato como únicas fuentes de carbono. En GA2, la expresión de *pdctA* no fue inducida en presencia de glucosa, succinato o 2-oxoglutarato ya que presentó niveles de actividad del orden del control. Por el contrario, en GA21 el *pdctA* se indujo fuertemente en glucosa, succinato o 2-oxoglutarato a niveles muy superiores a los obtenidos en la cepa control GA21(pMB220) e incluso en GA2.

La cepa GA21 presentó un perfil de inducción del promotor *pdctA* similar al de la cepa GA1 (*dctA*) de la cual se originó. Por lo tanto, esto no nos permite confirmar que GA21 sea el mutante *dctAdctB* deseado. No se descarta que pudiéramos estar tratando con un mutante espontáneo de GA1 que habría adquirido resistencia a Km en alguno de los pasos de selección.

La enzima testigo  $\beta$ -galactosidasa en GA2(pMB220) presentó una actividad basal de  $118 \text{ nmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg prot.})^{-1}$ . En la gráfica se muestra la desviación estándar de los valores obtenidos en cada ensayo.

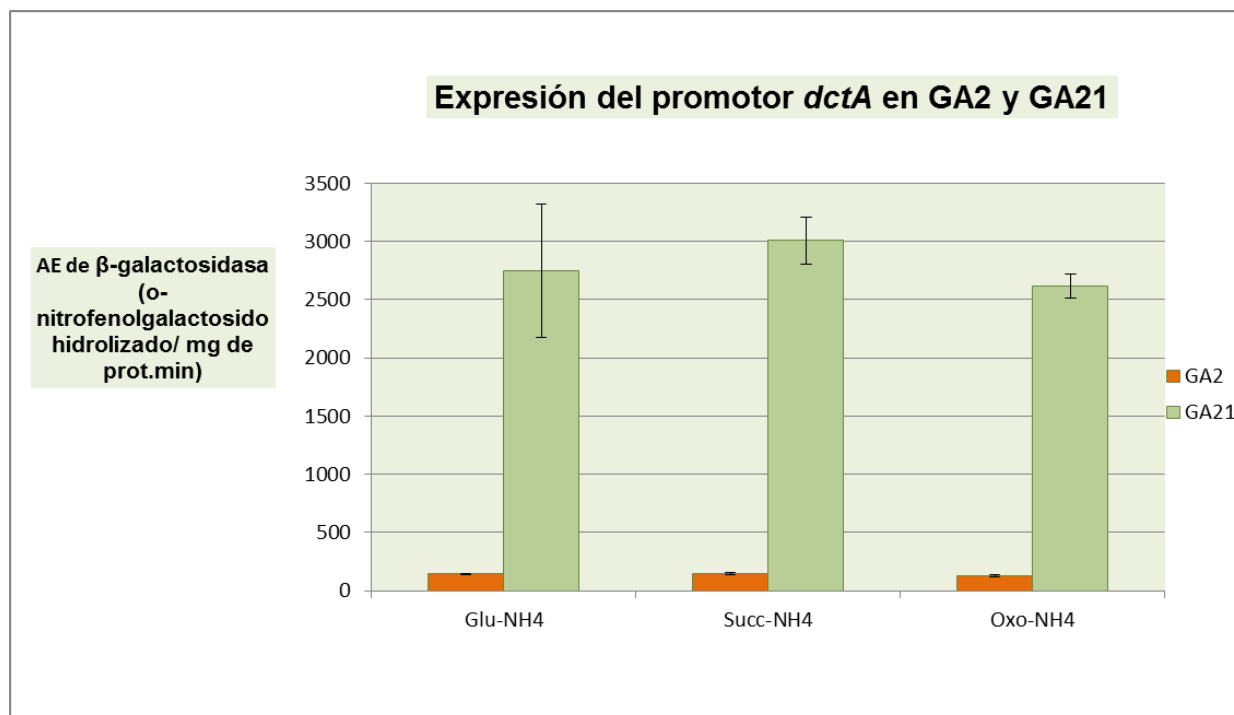


Figura 17: Actividad de enzima testigo  $\beta$ -galactosidasa en las cepas GA2 (*dctB*) y GA21 (*dctAdctB*) de *R. tropici* con el plásmido pRU103 (*pdctA::lacZ*). GA2(pMB220): 118 nmoles.min<sup>-1</sup>.(mg prot.)<sup>-1</sup>. Abreviaciones: Glu, glucosa; Succ, succinato y Oxo, 2-oxoglutarato. NH<sub>4</sub>: fuente nitrogenada, NH<sub>4</sub>Cl. Las células fueron incubadas en TY durante 24 horas, y se tomó una alícuota como inóculo para los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa de acuerdo a lo descrito en Materiales y métodos. Se sembró en tubos por triplicado para cada fuente de carbono.

4.5. Ensayo de nodulación de *P. vulgaris*

El fenotipo de los mutantes *dctB* también fue analizado en simbiosis con *P. vulgaris*. En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos a partir de plantas inoculadas con las cepas CIAT899, GA1 (*dctA*), GA2 (*dctB*) y GA21 (*dctAdctB*). Los valores presentados para cada condición o cepa corresponden al promedio de 6 réplicas del ensayo. Las plantas inoculadas con las distintas cepas fueron crecidas durante 30 días antes de ser analizadas. El peso seco de la parte aérea se determinó de acuerdo a lo descrito en Materiales y métodos.

Tabla 2: Ensayo de nodulación de *P. vulgaris* con las cepas de *R. tropici* CIAT899, GA1 (*dctA*), GA2 (*dctB*) y GA21 (*dctAdctB*).

| Cepa o condición     | Nodulación | Peso seco de la parte aérea <sup>a</sup> (g. planta <sup>-1</sup> ) |
|----------------------|------------|---------------------------------------------------------------------|
| CIAT899              | +          | 0.16 ± 0.01                                                         |
| GA1                  | +          | 0.11 ± 0.02                                                         |
| GA2                  | +          | 0.14 ± 0.02                                                         |
| GA21                 | +          | 0.10 ± 0.02                                                         |
| Con NO <sub>3</sub>  | -          | 0.26 ± 0.05                                                         |
| Control <sup>b</sup> | -          | 0.14 ± 0.02                                                         |

<sup>a</sup> El peso seco de la parte aérea se determinó a los 30 días luego de inocular las plantas y se promedió a partir del peso obtenido de 6 plantas en cada condición.

<sup>b</sup> Se utilizaron plantas control sin inocular y sin NO<sub>3</sub>

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Ensayo de perfil de crecimiento y actividad $\beta$ -galactosidasa del *pdctA* en las cepas CIAT899 y GA1 (*dctA*) de *R. tropici*

La asociación simbiótica rizobio-leguminosa ha sido estudiada ampliamente y en profundidad en virtud de su importancia económica y ambiental, ligada a la disminución del uso de fertilizantes nitrogenados en la agricultura mundial.

Como se mencionó previamente, los ADCs son esenciales para la FBN llevada a cabo por el bacteroide en el nódulo. Por lo tanto, el transporte y catabolismo de estos compuestos son necesarios para el mantenimiento de una simbiosis eficiente. El sistema de transporte de Dct específico para ADCs está conservado entre varias especies de rizobios. Dada su importancia en la FBN, este trabajo se dirigió al análisis del sistema Dct en la cepa modelo de *R. tropici* CIAT899. A los efectos de estudiar este sistema y la función transportadora de la proteína DctA en *R. tropici* CIAT899, en un principio se analizó la respuesta del promotor del gen *dctA* bajo distintas condiciones de crecimiento y contextos genómicos. Para esto se empleó el cósmido pRU103 que, como se mencionó en los Resultados, contiene el promotor *pdctA* de *R. leguminosarum* y el gen *lacZ* como gen testigo o reportero (Reid y Poole, 1998).

Se analizó el perfil de actividad de la enzima testigo  $\beta$ -galactosidasa, en las cepas CIAT899 y GA1 (*dctA*) conteniendo el cósmido pRU103. La cepa CIAT899 fue capaz de crecer en todas las fuentes de carbono analizadas, incluyendo carbohidratos y ácidos orgánicos. El análisis de actividad enzimática  $\beta$ -galactosidasa permitió establecer que el promotor *pdctA* fue altamente inducido en presencia de malato y fumarato de sodio. Sin embargo, en glucosa o en succinato o 2-oxoglutarato de sodio, los niveles de actividad fueron levemente superiores a los obtenidos a partir de la cepa salvaje con el vector sin inserto, usada como cepa control CIAT899(pMB220). El perfil de actividad  $\beta$ -galactosidasa de la cepa CIAT899 confirmó que los ADCs (principalmente, malato y fumarato de sodio), inducen el sistema Dct (ver Figura 10).

La cepa mutante GA1 (*dctA*) fue incapaz de crecer en presencia de los ADCs analizados, a excepción de succinato, donde exhibió un crecimiento significativo, aunque menor que el de la cepa salvaje. De acuerdo con los estudios previos

desarrollados en este laboratorio, el crecimiento de GA1 en presencia de succinato se debe a la función del sistema de transporte Kgt, específico para 2-oxoglutarato (Batista, 2009). La expresión del promotor *pdctA* fue inducida en presencia de todos los sustratos analizados, incluyendo carbohidratos y ácidos orgánicos. La glucosa, y las sales sódicas de succinato, fumarato, malato y 2-oxoglutarato, fueron capaces de inducir la expresión del gen *dctA* a niveles comparables entre ellos. En el caso de glucosa y succinato, la actividad  $\beta$ -galactosidasa fue casi 2.5 veces mayor que la de CIAT899 cultivada en las mismas condiciones.

De acuerdo con los trabajos previos de Reid y Poole (1998), en ausencia de la permeasa DctA en GA1 (*dctA*), el sistema de dos componentes DctBD perdería su especificidad y actuaría de forma promiscua. Los mutantes *dctA* de otros rizobios y de *Pseudomonas aeruginosa*, incubadas en condiciones similares a las estudiadas en este ensayo, expresarían una proteína DctB que estaría en un estado “activo”, capaz de reconocer un mayor espectro de sustratos o condiciones ambientales inductoras no específicas. Esta proteína DctB se autofosforilaría en todas las condiciones analizadas, se transferiría el grupo fosfato a DctD y se induciría la transcripción de *dctA* (Reid y Poole, 1998; Valentini y col., 2001). De este modo, DctB actuaría como sensor y DctA, además de ser la permeasa del sistema, regularía a la proteína DctB para la correcta detección y especificidad de la señal. Se ha propuesto que DctA actuaría sobre DctB, previniendo su autofosforilación en ausencia de ADCs. DctA controlaría así negativamente su propia síntesis (Yurgel y Kahan, 2004). Se debe destacar que, en la cepa salvaje, la proteína DctA se expresaría a un bajo nivel en condiciones no inducidas. Sin embargo, esta baja expresión de DctA sería suficiente para controlar la actividad de DctB.

Por otra parte, el perfil de actividad  $\beta$ -galactosidasa del promotor *pdctA* del cósmido pRU103, permitió confirmar que *R. tropici* se comportaría de modo similar a *R. leguminosarum* en lo que se refiere al control de la expresión del promotor *pdctA* por medio de DctBD (Reid y Poole, 1998). Sin embargo, el origen heterólogo de *pdctA* no permite realizar conclusiones definitivas.

Por otro lado, Reid y Poole (1998) lograron establecer que al incubar *R. leguminosarum* o su mutante *dctA* en condiciones limitadas de nitrógeno, *pdctA* era inducido, participando en este comportamiento el sistema DctBD y la proteína

reguladora NtrC. Estos investigadores analizaron el efecto sinérgico que ejercería la proteína reguladora NtrC en el transporte de ADCs en *R. leguminosarum*. Al usar amonio como fuente nitrogenada, los ADCs inducían la expresión del gen *dctA* de forma regular. Al sustituir el amonio por glutamato o aspartato como fuente de nitrógeno, el sistema regulador del metabolismo del nitrógeno NtrBC modificaría la expresión del gen *dctA*, incrementando el efecto inductor de DctD.

Por otro lado, también fue comprobado que en ausencia de DctA, *pdctA* podría ser inducido bajo condiciones de estrés osmótico o carencia de calcio (Batista, 1992). Por lo tanto, se podría sugerir que la sobreinducción de *pdctA* en GA1 sería consecuencia de la hipersensibilidad de DctBD en ausencia de *dctA* (como se discutió previamente), que detectaría ciertas condiciones de “estrés” como inductores. Estas condiciones de “estrés” no afectarían la expresión de *pdctA* en la cepa salvaje.

Batista y colaboradores (2009) determinaron los perfiles de crecimiento y de actividad  $\beta$ -galactosidasa del promotor de la permeasa KgtP (*pkgtP*) en *R. tropici* CIAT899 y en los mutantes GA1 (*dctA*) y CIAT899.317 (*kgtP*) incubados en condiciones similares a las realizadas en este trabajo (Tabla 1). Para determinar la actividad enzimática  $\beta$ -galactosidasa de las cepas mencionadas se empleó el cósmido pSB13 que contiene el promotor *pkgtP* de *R. leguminosarum* y el gen *lacZ* como gen testigo o reportero (Batista., 2009; ver Tabla 1). En la cepa salvaje, el promotor *pkgtP* se indujo específicamente en presencia de 2-oxoglutarato de sodio. En GA1, sin embargo, se comprobó que al incubar las células en presencia de glucosa, o las sales sódicas de succinato, malato, fumarato o 2-oxoglutarato como únicas fuentes de carbono, el *pkgtP* se expresaba a niveles uniformemente mayores que en la cepa salvaje, habiendo una marcada inducción en presencia de succinato y 2-oxoglutarato. Con el propósito de estudiar este comportamiento, Batista y colaboradores (2009) diseñaron los mutantes GA11 (*dctA**kgtS*) y GA12 (*dctA**kgtR*) y analizaron la actividad  $\beta$ -galactosidasa del promotor *pkgtP* en estos contextos genómicos y en condiciones similares a las de este trabajo (Tabla 1). Los investigadores concluyeron que la expresión del promotor *pkgtP* era muy baja en todas las condiciones de crecimiento comprobando así, que el sistema KgtSR sería fundamental para su inducción. Por lo tanto, en GA1 donde el promotor *pkgtP* fue altamente inducido en succinato, estaría mediando el sistema KgtSR, algo que no sucede en la cepa salvaje. Por lo tanto, se comprobó que existiría una interacción

entre los sistemas KgtSR y DctBD en ausencia de la proteína DctA.

Por otro lado, en el caso de la cepa mutante CIAT899.317, la inducción de *pkgtP* se vio afectada por la ausencia de KgtP, ya que el nivel de expresión fue superior al obtenido al incubar CIAT899 (o GA1) en presencia de glucosa, o las sales sódicas de succinato, fumarato, malato o 2-oxoglutarato. En este caso, se sugirió que ante la ausencia de KgtP, la proteína sensora KgtS sería más sensible a la presencia de distintos carbohidratos y ácidos orgánicos aumentando la inducción de *pkgtP* (Batista y col., 2009). Este comportamiento del sistema KgtSR-KgtP sería similar al de DctBD-DctA. Sin embargo, el perfil de expresión de *pdctA* en CIAT899.317 fue similar al obtenido en la cepa salvaje. Esto indicaría que las alteraciones en el sistema Kgt, no afectarían el funcionamiento del sistema Dct.

## 5.2. Comportamiento de los mutantes *dctB* en condiciones de vida libre y en simbiosis con *P. vulgaris*.

### 5.2.1. Perfil de crecimiento en MM de las cepas mutantes

En algunos rizobios, el sistema de dos componentes DctBD es transcripto desde un promotor constitutivo único que precede al gen *dctB* (Reid y Poole, 1998). Los genes *dctBD* de *R. tropici* podrían estar acoplados transcripcionalmente. En ese caso, la inserción del plásmido pHD2.1 en *dctB* impediría la síntesis de las dos proteínas DctB y DctD funcionales. Sin embargo, aún si los mutantes *dctB* pudiesen sintetizar una proteína DctD funcional, ésta no se debería activar debido a la ausencia de DctB. A pesar de esto, no se debería descartar que DctD se pudiese activar por otro mecanismo no definido.

Los mutantes *dctB* derivados de CIAT899 (GA2) y GA1 (GA21) fueron seleccionados en medio TY Nal Km y TY Nal Km Gm, respectivamente. Este fenotipo sugirió la efectiva cointegración del plásmido pHD2.1 en las cepas CIAT899 y GA1, generada por la recombinación entre regiones homólogas del mismo y del genoma de cada bacteria. En base a estos resultados, se seleccionó un clon mutante de cada uno para analizar el perfil de crecimiento y la actividad  $\beta$ -galactosidasa del promotor *pdctA*.

Como consecuencia de la cointegración de pHD2.1, la nueva cepa mutante GA2 (*dctB*) sería incapaz de expresar DctB. GA2 (*dctB*) no debería crecer en presencia de

ADCs, debido a la imposibilidad de transportarlos como fuente de carbono. Como se esperaba, GA2 fue incapaz de crecer en MM con malato o fumarato como únicas fuentes de carbono. Sin embargo, GA2 fue capaz de crecer en MM en presencia de succinato de sodio como única fuente de carbono, aunque más lentamente pero en niveles similares que la cepa salvaje. Este fenotipo *Fum<sup>-</sup>* y *Mal<sup>-</sup>* sería consecuencia de la inactivación del sistema Dct. De forma similar, el mutante GA21 (*dctAdctB*) creció en presencia de succinato como única fuente de carbono, presentando un fenotipo similar al de GA1 y GA2. En el caso de GA21, su perfil de crecimiento fue muy similar al de la cepa GA1 de la cual se originó. Suponemos que GA21 tiene cointegrado el plásmido pHD2.1 en su genoma en base a su fenotipo resistente a Km. Sin embargo, no pudimos confirmar la presencia de la mutación por fenotipo debido a que su perfil de crecimiento es indistinguible del de GA1. Por esta razón, se consideró a la cepa GA21 como un presunto mutante *dctAdctB* hasta que se confirme su identidad a través de análisis de biología molecular, como se comentará en breve.

Como mencionamos previamente, el sistema Kgt participa en el transporte de 2-oxoglutarato en *R. tropici* CIAT899. Además, ante la ausencia de DctA en la cepa GA1 (*dctA*) se activaría este sistema para el consumo de succinato (Batista, 2009). Podríamos suponer que, al igual que en GA1, en las cepas GA2 y GA21 se expresaría el sistema Kgt pero en este caso ante la ausencia de las proteínas DctB (y DctD?) y DctAB (y DctD?) activas, respectivamente. En el caso de GA2, la proteína DctA se estaría sintetizando normalmente. Por lo tanto, si en esta cepa el sistema Kgt estuviera involucrado en el transporte de succinato, la ausencia de la proteína DctA no sería el “disparador” de su activación. Sino que, en este caso, la ausencia de *dctB* estaría activando al sistema KgtSR para regular el transporte de succinato. Esta hipótesis debería ser probada por medio de la construcción de mutantes *kgtP* a partir de GA2 y GA21. Dichos mutantes no deberían crecer en sal sódica de succinato como única fuente de carbono.

A pesar de los resultados obtenidos, no se descarta que la resistencia a Km presente en los mutantes GA2 y GA21 pudiera haber surgido como consecuencia de mutaciones espontáneas. Sin embargo, la incapacidad de GA2 de crecer en MM con las sales sódicas de fumarato y malato como únicas fuentes de carbono, daría la pauta de que el plásmido pHD2.1 se insertó en el genoma de CIAT899 afectando el transporte de

los ADCs. Para confirmar la inactividad total del gen *dctB* en los mutantes obtenidos sería necesario realizar métodos moleculares no efectuados en este trabajo. Para verificar la inserción del plásmido en el genoma de *R. tropici* CIAT899 y de GA1 debería realizarse un *Southern blot*. Por otro lado, también sería necesario verificar la ausencia de expresión del gen *dctB*. Esto podría realizarse por medio de un Western blot o qPCR.

#### 5.2.2. Ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa del *pdctA* en las cepas GA2 (*dctB*) y GA21 (*dctAdctB*) de *R. tropici*

Las cepas mutantes GA2 (*dctB*) y GA21 (*dctAdctB*) fueron incubadas en MM en presencia de glucosa o las sales sódicas de succinato, 2-oxoglutarato o fumarato como únicas fuentes de carbono para la determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa del promotor *pdctA*. Para estos ensayos se utilizó la cepa GA2(pMB220) como control.

En el mutante GA2 el nivel de expresión de *pdctA* fue bajo, del orden del obtenido a partir de la cepa control en presencia de glucosa, succinato o 2-oxoglutarato como únicas fuentes de carbono. En el mutante GA21, la expresión del promotor *pdctA* se indujo fuertemente en presencia de glucosa y las sales sódicas de succinato o 2-oxoglutarato a niveles muy superiores a los obtenidos con la cepa control. Ambos mutantes *dctB* fueron incapaces de crecer en fumarato como única fuente de carbono y no se registró actividad  $\beta$ -galactosidasa.

En la cepa GA2, la expresión de *pdctA* fue baja en presencia de todas las fuentes de carbono utilizadas. En este mutante estaría ausente la proteína sensor DctB y como consecuencia, la proteína DctD, en caso de expresarse, no habría sido activada para inducir *pdctA* en presencia de succinato. Aun así, esto no se puede afirmar ya que, los valores de actividad obtenidos en succinato fueron similares a los obtenidos en la cepa salvaje. Por esta razón, para confirmar la ausencia de inducción del promotor *pdctA* en ADCs sería necesario analizar su actividad  $\beta$ -galactosidasa en presencia de fumarato y malato como únicas fuentes de carbono. En contraste, en GA21 la expresión de *pdctA* fue alta y en niveles similares en presencia de glucosa y las sales sódicas de succinato o 2-oxoglutarato. En la cepa GA21 estarían ausentes las proteínas DctAB (y DctD?) como consecuencia de la inserción del plásmido pHD2.1 en el genoma de la cepa mutante GA1 (*dctA*). En este caso, la inducción del promotor *pdctA* no podría ocurrir por acción

de DctD, ya que, como se mencionó previamente, esta proteína no sería sintetizada o no estaría activa en GA21 (y GA2). Sin embargo, no se descarta que si ocurriera la síntesis de DctD, esta fuera activada por algún regulador independiente de DctB.

En base a los resultados de expresión del *pdctA* de la cepa GA21, se podría sugerir que en el contexto genómico mutado de *R. tropici* en el cual no hay síntesis de DctAB (y DctD?), otros reguladores no identificados podrían intervenir en la inducción del promotor *pdctA* en presencia de glucosa o de las sales sódicas de succinato o 2-oxoglutarato como únicas fuente de carbono. En la cepa GA21, se podría proponer al sistema KgtSR como un posible regulador de la expresión del promotor *pdctA*. Por lo tanto, si en el contexto genómico mutado de GA21 el sistema KgtSR interviniera en la expresión de *pdctA* se confirmaría la existencia de *cross-talk* entre los sistemas DctBD y KgtRS. En GA2, el *cross-talk* no se haría evidente debido a la ausencia de inducción de *pdctA*.

### 5.3. Ensayos en plantas

Las cepas CIAT899, GA1 (*dctA*), GA2 (*dctB*) y GA21 (*dctAdctB*) indujeron la formación de nódulos radicales en *P. vulgaris*. En todos los casos, los nódulos inducidos tuvieron un aspecto normal y sin apariencia de seudonódulos. Sin embargo, los inducidos por las cepas mutantes no promovieron el crecimiento vegetal, ya que el peso seco de la parte aérea de la planta no fue significativamente diferente al obtenido de las plantas sin inocular. El peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas con la cepa CIAT899, inesperadamente tampoco fue diferente al obtenido de las plantas sin inocular. En este caso, las raíces de las plantas inoculadas con CIAT899 fueron parasitadas por hongos, lo cual debió haber perjudicado el crecimiento vegetal.

Las plantas inoculadas con las cepas GA1, GA2 y GA21 exhibieron un peso seco de la parte aérea similar a los valores obtenidos con plantas crecidas en ausencia de nitrógeno (KNO<sub>3</sub>), utilizadas como control. En otras especies de rizobio, como *S. meliloti*, los mutantes *dctA* fueron incapaces de fijar nitrógeno en simbiosis, pero los mutantes *dctB* y *dctD* mantuvieron una cierta capacidad de reducir el nitrógeno atmosférico en el nódulo (Engelke y col., 1987, 1989; Yarosh y col., 1989). En la tesis de doctorado de Silvia Batista (2002) se presentan los resultados de peso seco de la

parte aérea de plantas de *P. vulgaris* inoculadas con las cepas CIAT899 y GA1. El peso seco de las plantas inoculadas con GA1 no fue diferente al obtenido de las plantas control. Por lo tanto, GA1 no habría inducido crecimiento vegetal. Este resultado coincide con el obtenido en nuestro trabajo. Los mutantes GA2 y GA21, fueron capaces de inducir la formación de nódulos pero la inactivación de *dctAB* o únicamente de *dctB* habría determinado la ausencia de promoción del crecimiento vegetal. Sin embargo, sería necesario determinar la actividad Nitrogenasa de estos mutantes para verificar si existe o no actividad fijadora de nitrógeno. Por otro lado, también se debería repetir el ensayo para obtener una asociación simbiótica eficiente *R. tropici* CIAT899-*P. vulgaris* como control positivo.

A partir de los resultados obtenidos, podríamos sugerir que al igual que en otras cepas de rizobio, el gen *dctA* en *R. tropici* contribuiría al mantenimiento de la actividad Nitrogenasa y su eliminación en GA1 determinaría la ausencia de promoción del crecimiento vegetal como consecuencia de la falta de FBN. Asimismo, el mutante GA2 no habría inducido el crecimiento vegetal. Por lo tanto, el gen *dctB* también jugaría un rol esencial en la FBN.

## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los ensayos de crecimiento me permitieron comprobar que *R. tropici* CIAT899 tiene la capacidad de crecer en presencia de ADCs (succinato, fumarato y malato). El sistema de transporte involucrado sería Dct, en virtud de que la cepa de *R. tropici* GA1 (*dctA*) sólo fue capaz de crecer en presencia de succinato pero no en malato ni fumarato como únicas fuentes de carbono. De acuerdo con los estudios del laboratorio, el sistema Kgt, específico para 2-oxoglutarato, mediaría el transporte de succinato en GA1. Los mutantes GA2 (*dctB*) y GA21 (*dctAdctB*) obtenidos en este trabajo a partir de las cepas CIAT899 y GA1, respectivamente, presentaron un perfil de crecimiento similar al de GA1. De igual manera que en GA1, proponemos que el fenotipo Succ<sup>+</sup> de GA2 (*dctB*) y GA21 (*dctAB*) se debería a la función del sistema Kgt. Sin embargo, para afirmar esto deberá confirmarse la mutación *dctB* en GA2 y GA21 y la expresión de Kgt en ambos mutantes.

A partir de estudios previos desarrollados con GA1 (*dctA*), se sugirió que ante la ausencia de DctA, el sistema DctBD perdería su especificidad actuando de forma promiscua. Además, al incubar GA1 (*dctA*) en presencia de succinato se activaría el sistema Kgt mediado por el sistema de dos componentes KgtSR, algo que no sucede en la cepa salvaje. En contraste con esto, en el mutante GA2 (*dctB*) capaz de sintetizar DctA, se habría inducido el sistema Kgt en presencia de succinato, como lo evidencia el fenotipo Succ<sup>+</sup>. Por lo tanto, la ausencia de DctA no sería requisito esencial para inducir esta función en el sistema Kgt. De forma similar, en GA21 se expresaría el sistema Kgt en ausencia de DctA y DctB al incubar el mutante en presencia de succinato como única fuente de carbono.

En GA2 (*dctB*), la expresión de *pdctA* fue baja en todas las condiciones ensayadas, destacando la importancia del sistema DctBD para regular la expresión de *dctA* en la cepa salvaje. Al contrario que en GA2 (*dctB*), en GA21 (*dctAB*) fue inducido el *pdctA* en presencia de succinato, glucosa y 2-oxoglutarato aún en la ausencia de las proteínas DctA, DctB y posiblemente DctD activas. La elevada inducción del promotor *pdctA* en GA21 y no en GA2, sería dependiente de la ausencia o presencia de DctA, respectivamente. En este caso, reguladores no identificados estarían involucrados en la inducción del promotor *pdctA* en GA21, en presencia de las fuentes de carbono mencionadas. Por lo tanto, en los mutantes *dctB* analizados el sistema KgtSR induciría

el gen *kgtP* en presencia de succinato. Esta promiscua inducción, detectando un inductor no típico, se daría en contextos genómicos *dctB* y *dctAdctB*, sugiriendo que la ausencia de la proteína DctA no es la causante del comportamiento promiscuo. Además, en GA21 (*dctAdctB*) habría *cross-talk*, dado que KgtSR u otro sistema regulador activaría la expresión del gen *dctA*. Este *cross-talk* no se evidenciaría en GA2 (*dctB*).

En los ensayos de inoculación de *P. vulgaris*, las cepas GA2 (*dctB*) y GA21 (*dctAdctB*) indujeron la formación de nódulos con aspecto normal pero no indujeron el crecimiento vegetal. De todos modos, los resultados obtenidos no generan conclusiones definitivas debido a la carencia de un control positivo fiable y de ensayos de determinación de actividad Nitrogenasa. Por esta razón, sería necesario la realización de más ensayos en plantas de *P. vulgaris* que corroboren los resultados obtenidos.

Por otro lado, como se mencionó en la Discusión, es necesario realizar ensayos de biología molecular (Southern Blot o qPCR y Western Blot) para confirmar la inactividad total del gen *dctB* de los mutantes GA2 y GA21 y llegar a conclusiones del todo confiables.

## BIBLIOGRAFÍA

- Allen, O. N., y Allen, E. K. (1953) Morphogenesis of the leguminous root nodule. *Brookhaven Symp Biol* 6: 209-32.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Alejandro A. Schäffer, A. A., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Appleby, C. A., Bradbury, J. H., Morris, R. J., Wittenberg, B. A., Wittenberg, J. B. y Wright, P. E. (1983) Leghemoglobin. Kinetic, nuclear magnetic resonance, and optical studies of pH dependence of oxygen and carbon monoxide binding. *J. Biol Chem.* 258: 2254-9.
- Arias, A., Cerveñasky, C., Gardiol, A., y Martínez-Drets, G. (1979) Phosphoglucose isomerase mutant of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 137: 409-414
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., y Struhl, K. (1992) Current protocols in Molecular Biology. New York. John Wiley & Sons.
- Batut, J., Andersson, S. G., y O'Callaghan, D. (2004) The evolution of chronic infection strategies in the alpha-proteobacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 933-945.
- Batista, S. B. (2002) Tesis de Doctorado en Química. (Facultad de Química). PEDECIBA-Área Química. Departamento de Bioquímica del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Mecanismos de transporte de ácidos C<sub>4</sub>-dicarboxílicos en *Rhizobium tropici* CIAT899.
- Batista, S., Castro, S., Aguilar, O. M., y Martínez-Drets, G. (1992) Induction of C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport genes by external stimuli in *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.* 38: 51-55.
- Batista, S., Catalán, A. I., Hernández-Lucas, I., Martínez Romero, E., Aguilar, O. M., y Martínez-Drets, G. (2001) Identification of a system that allows a *Rhizobium tropici* *dctA* mutant to grow on succinate, but not on other C<sub>4</sub>-dicarboxylates. *Can. J. Microbiol.* 47: 509-518.

## BIBLIOGRAFÍA

- Batista, S., Patriarca, E. J., Taté, R., Martinez-Drets, G., y Gill, P. (2009) An alternative succinate (2-oxoglutarate) transport system in *Rhizobium tropici* is induced in nodules of *Phaseolus vulgaris*. *J. Bacteriol.* 191: 5057-5067.
- Becker, A., Schmidt, M., Jäger, W., y Pühler, A. (1995) New gentamicin-resistance and *lacZ* promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene* 162: 37-39.
- Beijerinck, M. W. (1888) Cultur des Bacillus radicola aus den Knochen. *Bot. Ztg.* 46: 740-750.
- Bergersen, J. F., y Turner, G. L. (1967) Nitrogen fixation by the bacteroid fraction of breis of soybean root nodules. *Biochimica et Biophysica Acta* 141: 507-515.
- Boesten, B., Batut, J., y Boistard, P. (1998) DctBD-dependent and -independent expression of the *Sinorhizobium (Rhizobium) meliloti* C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport gene (*dctA*) during symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 878-886.
- Bolton, E., Higgison, B., Harrington, A., y O'Gara, F. (1986) Dicarboxylic acid transport in *Rhizobium meliloti*: isolation of mutants and cloning of dicarboxylic acid transport genes. *Arch. Microbiol.* 144: 142-146.
- Bowen, G. D. y Rovira, A. D. (1999) The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.* 66: 1-102.
- Broughton, W. J., Jabbouri, S., y Perret, X. (2000) Keys to symbiotic harmony. *J. Bacteriol.* 182: 5641-5652.
- Cabanes, D., Boistard, P., y Batut, J. (2000) Symbiotic induction of pyruvate dehydrogenase genes from *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 483-493.
- Cárdenas, L., Holdaway-Clarke, T. L., Sánchez, F., Quinto, C., Feijó, J. A., Kunkel, J. G., y Helper, P. H. (2000) Ion changes in legume root hairs responding to nod factors. *Plant Physiol.* 123: 443-452.
- Cárdenas, L., Vidali, L., Dominguez, J., Pérez, H., Sánchez, F., Hepler, P. K., y Quinto, C. (1998) Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation Signals. *Plant Physiol.* 116: 871-877.

## BIBLIOGRAFÍA

- Chopra, J., Kaur, N., y Gupta, A. K. (2002) A comparative developmental pattern of enzymes of carbon metabolism and pentose phosphate pathway in mungbean and lentil nodules. *Physiol. Plant.* 24: 67-72.
- Colebatch, G., Trevaskis, B., y Udvardi, M. (2002) Symbiotic nitrogen fixation research in the postgenomics era. *New Phytol.* 153: 37-42.
- D'Antuono, A. L. (2006) Tesis de Doctorado en Biología Molecular y Biotecnología. Universidad Nacional de General San Martín. Instituto de Investigaciones Biotecnológicas. Aspectos moleculares de la interacción *Mesorhizobium loti* – *Lotus* spp.
- Delauney, A., y Verma, D. P. S. (1988) Cloned nodulin genes for symbiotic nitrogen fixation. *Plant Mol. Biol. Rep.* 6: 279-285.
- De Ley, J., y Rassel, A. (1965) DNA base composition, flagellation and taxonomy of the genus *Rhizobium*. *J. Gen. Microbiol.* 41: 85-91.
- Denarie, J., Debelle, F., y Prome, J. C. (1996) *Rhizobium* lipochitooligosaccharide nodulation factors - signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 503-535.
- D'Haese, W., y Holsters, M. (2002) Nod factor structures, responses and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* 12: 79-105.
- Dixon, R., y Kahn, D. (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 621-631.
- Downie, J. A. (1994) Signalling strategies for nodulation of legumes by rhizobia. *Trends Microbiol.* 2: 318-24.
- Driscoll, B. T., y Finan, T. M. (1993) NAD<sup>+</sup>-dependent malic enzyme of *Rhizobium meliloti* is required for symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Microbiol.* 7: 865-873.
- Driscoll, B. T., y Finan, T. M. (1997) Properties of NAD<sup>+</sup> and NADP-dependent malic enzymes of *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti* and differential expression of their genes in nitrogen fixing bacteroids. *Microbiol.* 143: 489-498.
- Duncan, M. J., y Fraenkel, D. G. (1979)  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 137: 415-419
- Dunn, M. F. (1998) Tricarboxylic acid cycle and anaplerotic enzymes in rhizobia. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 105-123.

## BIBLIOGRAFÍA

- Dymov, S. I., Meek, D. J., Steven, B., y Driscoll, B. T. (2005) Insertion of transposon Tn5tac1 in the *Sinorhizobium meliloti* malate dehydrogenase (*mdh*) gene results in conditional polar effects on downstream TCA cycle genes. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 17: 1318-1327.
- Engelke, T. H., Jording, D., Kapp, D., y Pühler, A. (1989) Identification and sequence analysis of the *Rhizobium meliloti* *dctA* gene encoding the C<sub>4</sub>-dicarboxylate carrier. *J. Bacteriol.* 171: 5551-5560.
- Engelke, T. H., Jagadish, M. N., y Pühler, A. (1987) Biochemical and genetical analysis of *Rhizobium meliloti* mutants defective in C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport. *J. Gen. Microbiol.* 133: 3019-3029.
- Finan, T. M., Wood J. M., y Jordan, D. C. (1983) Symbiotic properties of C<sub>4</sub>-dicarboxylic acid transport mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 154: 1403-1413.
- Fitzmaurice, A. M., y O’Gara, F. (1993) A *Rhizobium meliloti* mutant, lacking a functional  $\alpha$ -aminobutyrate (GABA) by-pass, is defective in glutamate catabolism and symbiotic nitrogen fixation. *FEMS Microbiol. Lett.* 109: 195–202.
- Fortin, M. G., Zelechowska, M., y Verma, D. P. S. (1985) Specific targeting of membrane nodulins to the bacteroid-enclosing compartment in soybean nodules. *EMBO J.* 4: 3041-3046.
- Frank, B. (1889) Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber Deut. Bot. Ges.* 7: 332-346.
- Fred, E. B., Baldwin, I. L., y McCoy, E. (1932) Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin Press. Madison. USA.
- Gardiol, A. E., Arias, A., Cerveñansky, C., y Martínez-Drets, G. (1987) Succinate dehydrogenase mutant of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 15: 1621-1623.
- Gardiol, A. E., Truchet, G. L., y Dazzo. F. B. (1987) Requirement of succinate dehydrogenase activity for symbiotic bacteroid differentiation of *Rhizobium meliloti* in alfalfa nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1947-1950.
- Giblin, L., Archdeacon, J., y O’Gara, F. (1996) Regulation of *dct* genes in the *Rhizobium meliloti*-alfalfa interaction. *J. Microbiol.* 12: 151-156.

## BIBLIOGRAFÍA

- Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J. C., Jaubert, M., Simon, D., Cartieaux, F., Prin, Y., Bena, G., Hannibal, L., Fardoux, J., Kojadinovic, M., Vuillet, L., Lajus, A., Cruveiller, S., Rouy, Z., Mangenot, S., Segurens, B., Dossat, C., Franck, W. L., Chang, S., Saunders, E., Brunce, D., Richardson, P., Normand, P., Dreyfus, B., Pignol, D., Stacey, G., Emerich, D., Verméglio, A., Médigue, C., y Sadowsky, M. (2007) Legumes symbioses: absence of *nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science* 316: 1307-1312
- Glenn, A. R., McKay, I. A., Arwas, R., y Dilworth, M. J. (1984) Sugar metabolism and the symbiotic properties of carbohydrate mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 130: 239-245.
- Gordon, A. J., Minchin, F. R., James, C. L., Komina, O. (1999) Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 120: 867-878.
- Graham, P. H. (1964) The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. *J. Gen. Microbiol.* 35: 511-517.
- Graham, P. H., Draeger, K. J., Ferrey, M. L., Conroy, M. J., Hammer, B. E., Martinez, E., Aarons, S. R., y Quinto, C. (1994) Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Can. J. Microbiol.* 40: 198-207.
- Graham, P. H., Viteri, S. E., Mackie, F., Vargas, A. T. y Palacios, A. (1982) Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Res.* 5: 121-128.
- Green, L. S., y Emerich D. W. (1997) *Bradyrhizobium japonicum* does not require  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase for growth on succinate or malate. *J. Bacteriol.* 179: 194-201.
- Green, L. S., Karr, D. B., y Emerich, D. W. (1998) Isocitrate dehydrogenase and glyoxylate cycle enzyme activities in *Bradyrhizobium japonicum* under various growth conditions. *Arch. of Microbiol.* 169: 445-451.
- Green, L. S., Li, Y., Emerich, D. W., Bergersen, F. J., y Day, D. A. (2000) Catabolism of  $\alpha$ -ketoglutarate by a *sucA* mutant of *Bradyrhizobium japonicum*: Evidence for an alternative tricarboxylic acid cycle. *J. Bacteriol.* 182: 2838-2844.

## BIBLIOGRAFÍA

- Hernández-Lucas, I., Pardo, M. A., Segovia, L., Miranda, J., y Martínez-Romero, E. (1995b) *Rhizobium tropici* chromosomal citrate synthase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3992-3997.
- Hirsch, A. M. (1999) Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Science* 4: 320-326.
- Hohnjec, N., y Becker, J. D. (1999) Genomic organization and expression properties of the MtSucS1 gene, which encodes a nodule-enhanced sucrose synthase in the model legume *Medicago truncatula*. *Mol. Gen. Genet.* 261: 514-22.
- Janausch, I. G., Zientz, E., Tran, Q. H., Kröger, A., y Unden, G. (2002) C<sub>4</sub>-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1553: 39-56.
- Jiang, J., Gu, B., Albright, L. M., y Nixon, T. (1989) Conservation between coding and regulatory elements of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium leguminosarum* *dct* genes. *J. Bacteriol.* 171: 5244-5253.
- Jordan, D. C. (1984) Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938, 321<sup>AL</sup>, pags. 234-254. In N.R. Krieg and J. G. Holt (ed.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. Williams y Wilkins, Baltimore.
- Jording, D., y Pühler, A. (1993) The membrane topology of the *Rhizobium meliloti* C<sub>4</sub>-dicarboxylate permease (DctA) as derived from protein fusions with *Escherichia coli* K12 alkaline phosphatase (PhoA) and  $\beta$ -galactosidase (*lacZ*). *Mol. Gen. Genet.* 241: 106-114.
- Jording, D., Sharma, P. K., Schmidt, R., Engelke, T., Uhde, C., y Pühler, A. (1992) Regulatory aspects of the C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport in *Rhizobium meliloti*: transcriptional activation and dependence on effective symbiosis. *J. Plant Physiol.* 141: 18-27.
- Karr, D. B., y Emerich, D. W. (2000) *Bradyrhizobium japonicum* isocitrate dehydrogenase exhibits calcium dependent hysteresis. *Arch. Bioch. Biophys.* 376: 101-108.
- Keele, B. B. Jr., Hamilton, P. B., y Elkan, G. H. (1969) Glucose catabolism in *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 97: 1184-1191.
- Keele, B. B. Jr., Hamilton, P. B., y Elkan, G. H. (1970) Glucose catabolism in *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 101: 698-704.

## BIBLIOGRAFÍA

- Kijne, J. W. (1975) The fine structure of pea root nodules. Vacuolar changes after endocytotic host cell infection by *Rhizobium leguminosarum*. *Physiol. Plant Pathol.* 5: 75-79.
- Kuster, H., y Fruhling, M. (1993) The sucrose synthase gene is predominantly expressed in the root nodule tissue of *Vicia faba*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 6: 507-14.
- Lee, J. H., Scholl, D., Nixon, B. T., y Hoover, T. R. (1994) Constitutive ATP hydrolysis and transcription activation by a stable, truncated form of *Rhizobium meliloti* DctD, a sigma 54-dependent transcriptional activator. *J. Biol. Chem.* 269: 20401-20409.
- Lloret, L., y Martínez-Romero, E. (2005) Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Rev. Latinoamericana de Microbiología* 47: 43-60.
- Long, S. R. (1996) *Rhizobium* symbiosis - Nod factors in perspective. *Plant Cell.* 8: 1885-1898.
- Long, S. R. (2001). Genes and signals in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Physiol.* 125. 69-72.
- Lodwig, E. M. (2001) Tesis de Ph.D. University of Reading School of Animal and Microbial Sciences. Regulation of Carbon Metabolism in *Rhizobium leguminosarum*.
- Martínez-Romero, E. (2002) Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant and Soil* 252: 11-23.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F. M., Franco, A. A., Graham, P., y Pardo, M. A. (1991) *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. es. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 417-426.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., Batut, J. (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *rhizobium* recipes? *Trends Microbiol.* 17: 458-466.
- McDermott, T. R., Griffith, S. M., Vance, C. P., y Graham, P. H. (1989). Carbon metabolism in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *FEMS Microbiol. Lett.* 63: 327-340.
- McDermott, T. R., y Kahn, M. L. (1992) Cloning and mutagenesis of the *Rhizobium meliloti* isocitrate dehydrogenase gene. *J. Bacteriol.* 174: 4790-4797.

## BIBLIOGRAFÍA

- McKay, I. A., Dilworth, M. J., y Glenn, A. R. (1988) C<sub>4</sub>-dicarboxylate metabolism in free-living and bacteroid forms of *Rhizobium leguminosarum* MNF3841. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1433-1440.
- McKay, I. A., Dilworth, M. J., y Glenn, A. R. (1989) Carbon catabolism in continuous cultures and bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* MNF 3841. *Arch. Microbiol.* 152: 606-610.
- Miao, G. H., y Hong, Z. (1992) Topology and phosphorylation of soybean nodulin-26, an intrinsic protein of the peribacteroid membrane. *J. Cell Biol.* 118: 481-90.
- Michiels, J., y Vanderleyden, J. (1994) Molecular basis of the establishment and functioning of a N<sub>2</sub>-fixing root nodule. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 612-630.
- Miller, J. H. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Minchin, F. R., Sheehy, J. E., Minguez, M. I., y Witty, J. F. (1985) Characterization of the resistance to oxygen diffusion in legume nodules. *Annu. Botany* 55: 53-60.
- Mortimer, M. W., McDermott, T. R., York, G. M., Walker, G. C., y Kahn, M. L. (1999) Citrate synthase mutants of *Sinorhizobium meliloti* are ineffective and have altered cell surface polysaccharides. *J. Bacteriol.* 181: 7608-7613.
- Mylona, P., Pawlowski, K., y Bisseling, T. (1995) Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* 7: 869-885.
- Nogales, J., Campos, R., BenAbdelkhalek, H., Olivares, J., Lluch, C., y SanJuan, J. (2002) *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *American Phytopathol. Society* 15: 225-232.
- Oke, V., y Long, S. R. (1999) Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Curr. Opinion. Microbiol.* 2: 641-646.
- Oke, V., y Long, S. R. (2002) Bacterial genes induced within the nodule during the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Mol. Microbiol.* 32: 837-849.
- Ott, T., van Dongen, J. T., Gunther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., y Udvardi, M. K. (2005) Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root

- nodules but not for general plant growth and development. *Curr. Biol.* 15: 531-5.
- Patriarca, E. J., Tatè, R., y Laccarino, M. (2002) Key role of bacterial  $\text{NH}_4^+$  metabolism in rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 203-222.
  - Perret, X., Staehelin, C., y Broughton, W. J. (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 180-203.
  - Poole, P. S., Blyth, A., Reid, C. J., y Walters, K. (1994) *myo*-Inositol catabolism and catabolite regulation in *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*. *Microbiol.* 140: 2787-2795.
  - Poole, P. S., Reid, C., East, A. K., Allaway, D., Day, M., y Leonard, M. (1999) Regulation of the *mdh-sucCDAB* operon in *Rhizobium leguminosarum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 176: 247-255
  - Poole, P. S., Schofield, N. A., Reid, C. J., Drew, E. M., y Walshaw, D. L. (1994) Identification of chromosomal genes located downstream of *dctD* that affect the requirement for calcium and the lipopolysaccharide layer of *Rhizobium leguminosarum*. *An. Microbiol. (Rio J)* 140: 2797-2809.
  - Preston, G. G., Zeiher, C., Wall, J. D., y Emerich, D. W. (1989) Acetate activating enzymes of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *App. Environ. Microbiol.* 55: 165-170.
  - Preston, G. G., Wall, J. D., y Emerich, D. W. (1990) Purification and properties of acetyl-CoA synthetase from *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *J. Bioch.* 267: 179-183.
  - Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Felle, H. H., Umehara, Y., Gronlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., y Stougaard, J. (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature.* 425: 585-592.
  - Rawsthorne, S., y LaRue, T. A. (1986) Metabolism under microaerobic conditions of mitochondria from cowpea nodules. *Plant Physiol.* 81: 1097-1102.
  - Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R., y Blankenship, R. E. (2004) The natural history of nitrogen fixation. *Mol. Biol. Evol.* 21: 541-554.

## BIBLIOGRAFÍA

- Reibach, P. H., y Streeter, J. G. (1983) Metabolism of  $^{14}\text{C}$ -labeled photosynthate and distribution of enzymes of glucose metabolism in soybean nodules. *Plant Physiol.* 72: 634-640.
- Reid, C. J., y Poole, P. S. (1998) Roles of DctA and DctB in signal detection by the dicarboxylic acid transport system of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 180: 2660-2669.
- Robertson, J. G., y Lyttleton, P. (1982) Coated and smooth vesicles in the biogenesis of cell walls, plasma membranes, infection threads and peribacteroid membranes in root hairs and nodules of white clover. *J. Cell. Sci.* 58: 63-78.
- Rolfe, B. G. (1988) Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation. *Biofactors* 1: 3-10.
- Ronson, C. W. y Primrose, S. B., (1979) Carbohydrate metabolism in *Rhizobium trifolii*: identification and symbiotic properties of mutants. *J. Gen. Microbiol.* 112: 77-88.
- Roth, L. E., y Stacey, G. (1989) Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. *Eur. J. Cell Biol.* 49: 13-23.
- Saier, M. H., Jr., Tran, C. V., y Barabote, R. D. (2006) TCDB: the transporter classification database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Res.* 34: 181-186.
- Salminen, S. O., y Streeter, J. G. (1992) Labeling of carbon pools in *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* bacteroids following incubation of intact nodules with  $^{14}\text{CO}_2$ . *Plant Physiol.* 100: 597-604.
- Sheehy, J. E., Minchin, F. R., y Witty, J. F. (1985). Control of nitrogen fixation in a legume nodule - an analysis of the role of oxygen diffusion in relation to nodule structure. *Ann. Botany* 55: 549-562.
- Skorupska, A., Janczarek, M., Marczak, M., Mazur, A., y Król, J. (2006) Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microbial Cell Fac.* 16: 5-7.
- Slooten, J. C., Bhuvanavari, T. V., Bardin, S., y Stanley, J. (1992) Two  $\text{C}_4$ -dicarboxylate transport systems in *Rhizobium* sp. NGR234: rhizobial dicarboxylate transport is essential for nitrogen fixation in tropical legume symbioses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 5: 179-186.

## BIBLIOGRAFÍA

- Somasegaran, P., y Hoben, H. J. (1994) Handbook for Rhizobia. Methods in legume-*Rhizobium* Technology. Springer-Verlag New York, Inc.
- Spaink, H. P. (2000) Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol* 54: 257-88.
- Stovall, I., y Cole, M. (1978) Organic acid metabolism by isolated *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Plant Physiol.* 61: 787-790.
- Tabrett, C. A., y Copeland, L. (2000) Biochemical controls of citrate synthase in chickpea bacteroids. *Arch. Microbiol.* 173: 42-48.
- Thummler, F., y Verma, D. P. S. (1987) Nodulin-100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free heme in nodules. *J. Biological Chem.* 262: 14730-14736.
- Tony-Meyer, L., y Kunzler, P. (1996) The *Bradyrhizobium japonicum* aconitase gene (*acnA*) is important for free-living growth but not for an effective root nodule symbiosis. *J. Bacteriol.* 178: 6166-6172.
- Trinick, M. J. (1979) Structure of nitrogen-fixing nodules formed by *Rhizobium* on roots of *Parasponia andersonii* Planch. *Can. J. Microbiol.* 25: 565-578.
- Udvardi, M. K., y Day, D. A. (1997) Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 493-523.
- Van Kammen, A. (1984) Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2: 43-45.
- Vance, C. P., y Gantt, J. S. (1992) Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules. *Physiol. Plantarum.* 85: 266-275.
- Vasse, J., Billy, F., Camut, S., Truchet, G., y Centre National de la Recherche Scientifique (1990) Correlation between ultrastructural differentiation of bacterioids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* 172: 4295-4306.
- Valentini, M., Storelli, N., y Lapouge, K. (2011) Identification of C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 193: 4307-4316
- Vincent, J. M. (1970) A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. International Biological Programme, Blackwell Scientific publications, Oxford.

## BIBLIOGRAFÍA

- Walshaw, D. L., Wilkinson, A., Mundy, M., Smith, M., y Poole, P. S. (1997) Regulation of the TCA cycle and the general amino acid permease by overflow metabolism in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology-UK* 143: 2209-2221.
- Watson, R. J. (1990) Analysis of the C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport genes of *Rhizobium meliloti*: nucleotide sequence and deduced products of *dctA*, *dctB*, and *dctD*. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 3: 174-181.
- Watson, R. J., Chan, Y. K., Wheatcroft, R., Yang, A. F. y Han, S. H. (1988) *Rhizobium meliloti* genes required for C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport and symbiotic nitrogen fixation are located on a megaplasmid. *J. Bacteriol.* 170: 927-934.
- Wang, Y. P., Birkenhead, K., Boesten, B., Manian, S. y O’Gara, F. (1989) Genetic analysis and regulation of the *Rhizobium meliloti* genes controlling C<sub>4</sub>-dicarboxylic acid transport. *Gene* 85: 135-144.
- Wang, Y. K., Lee, J. H., Brewer, J. M., y Hoover, T. R. (1997) A conserved region in the  $\sigma^{54}$ -dependent activator DctD is involved in both binding to RNA polymerase and coupling ATP hydrolysis to activation. *Mol. Microbiol.* 26: 373-386.
- White, J. (2006) Tesis de Ph.D. The University of Reading. School of Biological Sciences. Amino acid transport and metabolism by *Rhizobium leguminosarum*.
- White, J., Prell, J., James, E. K., y Poole, P. (2007) Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiol.* 144: 604-614.
- Willems, A. (2006) The taxonomy of rhizobia: an overview. Springer-Verlag New York, Inc. 287: 3-14.
- Wojcienchowski, M. F., Lavin, M., y Sanderson, M. J. (2004) A phylogeny of legumes (*Leguminosae*) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *Am. J. Bot.* 91: 1846-1862.
- Yarosh, O. K., Charles, T. C., y Finan, T. M. (1989) Analysis of C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport genes in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* 3: 813-823.
- Young, J. P. W. (1992) Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. *Biol. Fixation*. New York. pp 43-79.
- Yurgel, S. N., y Kahn, M. L. (2004) Dicarboxylate transport by rhizobia. *FEMS Microbiol Rev.* 28: 489-501.

## BIBLIOGRAFÍA

- Zehr, J. P., Wyman, M., Miller, V., Duguay, L., y Capone, D. G. (1993) Modification of the Fe protein of nitrogenase in natural populations of *Trichodesmium thiebautii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 669-676.

APÉNDICE

Medio LB

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| Bacto triptona                      | 10 g    |
| Extracto de levadura                | 5 g     |
| NaCl <sub>2</sub>                   | 10 g    |
| H <sub>2</sub> O desionizada c.s.p. | 1000 ml |

Medio TY

|                                      |         |
|--------------------------------------|---------|
| Bacto triptona                       | 5 g     |
| Extracto de levadura                 | 3 g     |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | 2 ml    |
| H <sub>2</sub> O desionizada c.s.p.  | 1000 ml |

Medio Mínimo (MM)

|                                      |                 |
|--------------------------------------|-----------------|
| K <sub>2</sub> POH <sub>4</sub>      | 0.1 g (0.57 mM) |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 0.1 g (0.73 mM) |
| MgSO <sub>4</sub>                    | 0.1 g (0.8 mM)  |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0.147 g (1 mM)  |
| FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O | 5 mg (18.5 µM)  |
| MOPS                                 | 2.1 g (10 mM)   |
| Solución C                           | 1 ml            |
| H <sub>2</sub> O desionizada c.s.p.  | 1000 ml         |
| Se ajusta el pH a 6.8 con NaOH 2M.   |                 |

Solución C

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| Tiamina.HCl                         | 1 g     |
| Pantotenato de calcio               | 2 g     |
| Biotina                             | 0.2 g   |
| H <sub>2</sub> O desionizada c.s.p. | 1000 ml |
| Se esteriliza por filtración.       |         |

